

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. M. Frimmer

Die Isolierung
und biochemische Charakterisierung von
Plasmamembranen aus Pansenepithelzellen
(Untersuchungen über Transport-ATPasen und
deren Beeinflussung durch mono- und divalente
Ionen sowie einige Hemmstoffe in Verbindung mit
Transportphänomenen der Pansenschleimhaut)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Bernd Tellhelm
Tierarzt aus Arnstadt

Gießen 1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. M. Frimмер

Die Isolierung
und biochemische Charakterisierung von
Plasmamembranen aus Pansenepithelzellen
(Untersuchungen über Transport-ATPasen und
deren Beeinflussung durch mono- und divalente
Ionen sowie einige Hemmstoffe in Verbindung mit
Transportphänomenen der Pansenschleimhaut)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Bernd Tellhelm
Tierarzt aus Arnstadt

Gießen 1971

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmler

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. D. Hegner

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1971



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden	8
2.1. Präparative Methoden	8
2.1.1. Versuchstiere	8
2.1.2. Präparation von Plasmamembranen aus Pansenepithelzellen	8
2.1.3. Elektronenmikroskopische Unter- suchungen	10
2.2. Enzymatische Methoden	12
2.2.1. ATPasen	12
2.2.1.1. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$	12
2.2.1.2. $\text{K}^+ - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$	12
2.2.1.3. $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$	12
2.2.1.4. $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$	12
2.2.2. 5'-Nucleotidase	13
2.2.3. Inosindiphosphatase	13
2.2.4. Saure- und alkalische Phosphatase	13
2.2.5. Glucose-6-Phosphatase	13
2.2.6. Succinatdehydrogenase	13
2.2.7. β -Glucuronidase	13
2.3. Chemische Methoden	14
2.3.1. Proteinbestimmung	14
2.3.2. Bestimmung von anorganischem Phosphat	14
2.4. Statistische Berechnungen	14
3. Verwendete Chemikalien und Reagentien	15
4. Ergebnisse	16
4.1. Ergebnisse der Präparation	16
4.1.1. Isolierung von Plasmamembranen	16

4.1 2.	Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der ATPasen von der eingesetzten Enzymmenge	23
4.1.3.	Verhalten der spezifischen Aktivitäten der ATPasen während des Alterungsprozesses	24
4.2.	Abhängigkeit der ATPasen von der Ionenkonzentration	30
4.2.1.	Mg^{++} -ATPase	30
4.2.2.	Ca^{++} -ATPase	31
4.2.3.	Na^{+} - K^{+} -aktivierbare Mg^{++} -ATPase	34
4.3.	Bestimmung des pH-Optimums	36
4.4.	Durchschnittliche spezifische Aktivitäten der ATPasen	38
4.5.	Einfluß von K^{+} und Na^{+} auf die Ca^{++} -ATPase	39
4.6.	Einfluß von Ammoniak und Harnstoff auf die Na^{+} - K^{+} - Mg^{++} -ATPase	42
4.7.	Hemmung der Na^{+} - K^{+} -ATPase durch Ouabain	45
4.8.	ATPase-Hemmung durch SH-Reagentien	47
5.	Diskussion	50
6.	Zusammenfassung	60
7.	Literaturverzeichnis	61

1. Einleitung

Der transepitheliale Transport niedermolekularer Abbauprodukte und monovalenter Ionen im Pansen hat in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen (Dobson¹, Hörnicke², Keynes³), wobei die Untersuchungen über Transportmechanismen im Vergleich zu anderen Epithelien (Ussing 1949 zitiert nach Stein⁴) bisher nur vereinzelt in der Literatur beschrieben sind.

Für das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Ereignisse und deren pharmakologische Beeinflussung bei der Permeation von Metaboliten und Ionen durch biologische Membranen können enzymatische Studien an Plasmamembranen bedeutsam sein (Stein⁴, Bittar⁵, Skou⁶). Man kann die Permeationsvorgänge durch biologische Membranen zur Zeit unter Zugrundelegung hypothetischer und experimenteller Evidenzen mit drei prinzipiell unterschiedlichen Mechanismen beschreiben:

1. Die freie Diffusion von Metaboliten kann für verschiedene biologische Membranen als gesichert angesehen werden (Stein⁴). Für die Diffusion von lipoidlöslichen Substanzen besteht dabei eine Korrelation zwischen Molekulargewicht und dem Verteilungskoeffizienten Lipid — Wasser. Darüberhinaus kann für biologische Membranen ein molekularer Siebeffekt angenommen werden (Collander⁷). Hodgkin und Keynes⁸ vermuten als Diffusionswege für hydrophile niedermolekulare Metabolite und hydratisierte Ionen in der Membran wassergefüllte Kanäle. Für selektive Diffusion wird für bestimmte biologische Membranen einerseits das von Passow⁹ diskutierte Modell der fixierten Ladungen in der Membran als Erklärung herangezogen. Ein weiterer Spezialfall der freien Diffusion, der Ionenselektivität einbeziehen kann, ist das von

Heckmann⁵⁵ als "single file"-Diffusion bezeichnete Diffusionsmodell.

2. Erleichterte Diffusion

Die prinzipielle Voraussetzung für eine erleichterte Diffusion von Metaboliten ist ein vorliegendes Konzentrationsgefälle bzw. eine elektrochemische Potentialdifferenz zwischen beiden Seiten einer biologischen Membran. Ein Spezialfall der erleichterten Diffusion ist der von Wilbrandt¹⁰ beschriebene Effekt eines Gegenstromprinzips, bei dem ein bestehender Teilchenfluß die Permeation einer zweiten Teilchenpopulation beschleunigen kann. Solche Kopplungseffekte können biologisch bedeutsam sein und auch bei transepitheliale Transport vorkommen. Wesentliches Merkmal der erleichterten Diffusion ist, daß sie nicht unmittelbar von Energie aus dem katabolen Stoffwechsel abhängig ist.

3. Aktiver Transport

Das Wesen des aktiven Transportes besteht in der Abhängigkeit eines Teilchenflusses von kataboler chemischer Energie der Zelle, wobei der transmembranöse Flux entgegen einem Konzentrationsgefälle bzw. einem elektrochemischen Gradienten erfolgt (Bergauf-Transport). Von Skou¹¹ wurde zuerst nachgewiesen, daß ein in der Membran lokalisiertes Enzymsystem für den primären gekoppelten aktiven Transport von Na^+ und K^+ die biochemische Voraussetzung darstellt. Dieser Na^+ - K^+ -Transport ist an die Hydrolyse von ATP gekoppelt und kommt in allen lebenden tierischen Zellen vor. Von Duncan¹² wurde diese Transport-ATPase als Mechano-Enzymkomplex charakterisiert. In erregbaren Zellen (Nerven und Muskeln) besteht die Aufgabe dieses Transportsystems vorwiegend im Aufbau eines Membranpotentials. Das System ist spezialisiert auf sehr schnelle Permeabilitätsänderungen für Na^+ und K^+ als Voraussetzung für reversible Potentialänderungen.

An nicht erregbaren Organzellen kommen diesem System zellspezifische Funktionen bezüglich der Kopplung mit dem Transport von Ionen und Metaboliten zu (Albers¹³, Ring¹⁴, Crane¹⁵). Von Schatzmann¹⁶ wurde gezeigt, daß zwischen der spezifischen Aktivität der Na^+ - K^+ -abhängigen ATPase und dem aktiven Flux von Na^+ und K^+ ein direkter Zusammenhang besteht. Eine spezifische Hemmung des Na^+ - K^+ -Fluxes durch Herzglykoside geht parallel mit einer Hemmung der Na^+ - K^+ -ATPase. Whittam und Ager¹⁷ haben außerdem bewiesen, daß eine direkte Beziehung zwischen der Ouabain-hemmbareren Na^+ - K^+ -ATPase, der Bildung von anorganischem Pi aus ATP und dem Na^+ - K^+ -Flux besteht. Primärer aktiver Transport wurde außer für Na^+ und K^+ für Carbohydrate und Aminosäuren festgestellt (Albers¹³, Ring¹⁴). Neben diesem primären Transport wurden in den letzten Jahren Beispiele für sekundären und tertiären Co-Transport von Metaboliten an das Na^+ - K^+ -Transportsystem postuliert. Das Prinzip dieses Co-Transportes besteht darin, daß der beim aktiven Ionenflux aufgebaute Gradient die treibende Kraft für den Flux eines Metaboliten darstellt (Albers¹³, Ring¹⁴, Crane¹⁵, Christensen¹⁸), wobei diese Substanzen vermutlich mit Na^+ zusammen an einem substratspezifischen Carrier durch die Zellmembran diffundieren. Von Koefoed-Johnson und Ussing¹⁹ wurde für epitheliale Zellager (Froschhaut) der Nachweis erbracht, daß ein aktives System für den Transport von Na^+ von außen nach innen vorkommt. Spätere Untersuchungen ergaben, daß dieser aktive Na^+ -Transport mit einem Wassertransport gekoppelt und vermutlich für den gesamten Wasserhaushalt des Organismus verantwortlich ist (Diamond^{20,21}).

In Plasmamembranen sowie einigen subzellulären Membranen kommt eine Ca^{++} -abhängige ATPase vor (Stam²², Borle²³, Schatzmann^{24,25}, Manery²⁶, Albers¹³). Dieses Enzymsystem bewirkt in Mikrosomen (Hasselbach zitiert nach Albers¹³,

Ohtsuki²⁷) eine aktive Akkumulation von Ca^{++} . Für Mitochondrien wird ein Zusammenhang der Ca^{++} -ATPase mit der Atemkette bzw. der oxydativen Phosphorylierung nachgewiesen (Chance²⁸, Lehninger, 22. Mosbacher Kolloquium, unveröffentlicht). Über die Bedeutung der Ca^{++} -ATPase in Plasmamembranen wird angenommen, daß diese die intrazelluläre Konzentration von Ca^{++} , das auf verschiedene Enzymsysteme hemmend wirkt, durch aktiven Transport aus der Zelle niedrig hält (Schatzmann^{24,25}).

Neuere Untersuchungen von Munday et al.²⁹ und Reiser et al.³⁰ an intestinalen Epithelzellen ergaben, daß der aktive Transport von Ca^{++} einerseits mit dem von freien Fettsäuren interferiert. Andererseits beeinflussen Ca -Ionen den aktiven Transport von L-Leucin.

Die quantitativ wichtigsten Substanzen (Übersicht Dobson¹), die durch die Pansenschleimhaut permeieren, sind Wasser, CO_2 , Essig-, Propion- und Buttersäure, NH_3 , Na^+ , Cl^- und K^+ . Dazu kommen eine Reihe von lipoidlöslichen nicht dissoziierten Substanzen, insbesondere auch Pharmaka, die die Pansenschleimhaut in Abhängigkeit ihres pK-Wertes und des pH im Pansenmilieu passieren. Nach der uns vorliegenden Literatur über Transportmechanismen am Pansen kann der aktive Transport von Cl -Ionen (Scott³¹, Sperber und Hyden³², Dobson^{1,33}, Stevens³⁴) und Na -Ionen (Dobson^{1,33}, Stevens³⁴, Engelhardt³⁵) als gesichert angesehen werden. Stevens und Stettler³⁶ stellten an isoliertem Pansenepithel bei Fehlen eines Konzentrationsgefälles einen Transport von Acetat-Ionen gegen eine elektrische Potentialdifferenz fest. Bestätigt wurden diese Befunde durch neuere Arbeiten von Stevens et al.³⁷, die einen aktiven Transport entgegen einem elektrochemischen Gradienten von Acetat-Ionen und anderen schwachen organischen Säuren (3,3 - Dimethylbutyrat, 5,5 - Dimethyloxazolidin - 2,4 - dion) vom Blut in Richtung Pansenlumen und von schwachen organischen Basen (Morphin, Strychin) in entgegengesetzter Richtung feststellten.

Als treibende Kraft wird neben dem aktiven Transport ein pH-Gradient zwischen bisher nicht eindeutig definierten Epithelcompartimenten und der Badelösung diskutiert. Aus der zuletzt genannten Hypothese wird ein Modell entwickelt, das den transepithelialen Transport von schwachen organischen Säuren und Basen über einen elektrochemischen Gradienten von H-Ionen erklären kann.

Von Keynes³ konnte unter bestimmten Bedingungen in vitro ein aktiver Transport von K^+ in Richtung Pansenlumen wahrscheinlich gemacht werden. Hörnicke² vermutet einen aktiven Transport von Aminosäuren, der jedoch bisher nicht experimentell belegt ist. Eine Literaturübersicht über die Wasserbewegung wird von Engelhardt³⁸ gegeben. Der aktive Na^+ -Transport in der Pansenschleimhaut wird dabei als ein mögliches Regulativ für die Wasserbewegung angenommen.

Das Ausmaß der Beteiligung der erleichterten Diffusion am transepithelialen Transport kann nach den bisherigen Erkenntnissen nicht genau bestimmt werden, da für einige wichtige Substanzen die Beteiligung eines aktiven Transportmechanismus nicht ausgeschlossen werden kann. Untersuchungen von Stevens³⁶ hatten gezeigt, daß die Resorptionsrate flüchtiger Fettsäuren im wesentlichen von ihrer Konzentration im Pansen abhängig ist. Einen wesentlichen Einfluß auf die Permeabilität der Pansenschleimhaut hat der pH-Wert des Panseninhaltes. Mit sinkendem pH steigt der Anteil der undissoziierten flüchtigen Fettsäuren und damit die Resorptionsrate, da die nicht dissoziierten Moleküle infolge ihrer Lipoidlöslichkeit schneller durch die Schleimhaut hindurchtreten als dissoziierte. Bei pH 7,4 sind die flüchtigen Fettsäuren im Pansen praktisch vollständig dissoziiert. Danielli et al. (nach Engelhardt³⁵) nahmen an, daß bei diesem pH-Wert die Passage der Fettsäuren nahezu ausschließlich als Anionen durch wasserge-

füllte Poren erfolgt.

Der Transport von NH_3 durch Pansenepithel erfolgt entlang einem Konzentrationsgradienten (Mc Donald³⁹, Hörnicke²). Ähnlich wie bei den Fettsäuren ist die Permeationsrate abhängig vom pH des Panseninhaltes (Engelhardt³⁵, Hörnicke²). Sie nimmt mit steigendem pH zu, da bei niedrigem pH NH_3 weitgehend dissoziiert ist, und die Permeabilität der Pansenschleimhaut für nicht dissoziierte Ammoniakmoleküle größer ist. Weiter kann gesagt werden, daß eine erleichterte Diffusion für CO_2 , CH_4 , H_2S , CO und HCN (Hörnicke²) sowie für K^+ (Dobson¹) wahrscheinlich ist.

In orientierenden Untersuchungen von Schnorr et al.⁴⁰ konnte das Vorkommen einer Mg^{++} -, Na^+ - K^+ - Mg^{++} - und Ca^{++} -aktivierbaren ATPase an isolierten Plasmamembranen aus Pansenepithelzellen nachgewiesen werden. Elektronenoptisch-histochemisch gelang die Lokalisation der Mg^{++} - und Ca^{++} -ATPase in verschiedenen Abschnitten des Vormagenepithels der Ziege (Schnorr⁴¹). In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren über die Isolierung von Epithelzellmembranen aus basalen Zellen der Pansenschleimhaut beschrieben. Außerdem werden einige biochemische Eigenschaften der Phosphohydrolasen (E.C. 3.6.1.3), die als enzymatische Grundlage eines aktiven Transportsystems anzusehen sind, untersucht und charakterisiert.

Problemstellung

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war:

1. Plasmamembranen aus Epithelzellen vom Pansen des Rindes anhand der bisher bekannten Kriterien über einige Leitenzyme zu isolieren und mit möglichst hoher Ausbeute anzureichern.
2. Biochemische Charakterisierung der nachweisbaren Phosphohydrolasen (E.C. 3.6.1.3). Es war zu prüfen, welche Art der Aufbewahrung von Plasmamembranen für die spezifische Aktivität der ATPasen am Schonendsten ist und welche Ionen-Konzentrationen für die Aktivierung der
 - a) Ca^{++} -ATPase
 - b) Mg^{++} -ATPase
 - c) Na^{+} - K^{+} - Mg^{++} -ATPaseoptimal sind.
3. Für Na^{+} - K^{+} - Mg^{++} - und Mg^{++} -ATPase sollte das pH-Optimum definiert werden.
4. Es wurden Hemmstoffe von ATPasen zur Charakterisierung der Enzyme untersucht (Ouabain, SH-Reagentien).

2. Methoden

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Versuchstiere

Für die Entnahme der Vormagenabteilungen wurden vorwiegend männliche Schlachttiere mit einem durchschnittlichen Alter von ca. 1 1/2 Jahren verwendet. In Bezug auf Rasse, Haltung und Fütterung war das Tiermaterial weitgehend heterogen. Unmittelbar nach der Tötung wurde ein Teil des Pansens (Pansenvorhof) abgetrennt und in einem Kühlbehälter (0° bis $+4^{\circ}\text{C}$) bis zur Aufarbeitung aufbewahrt. Alle Arbeitsgänge wurden bei $+2^{\circ}$ bis $+4^{\circ}\text{C}$ im Kältelabor vorgenommen. Von der Entnahme des Organs bis zum Beginn der Bearbeitung lag ein Zeitraum von ca. 30 Minuten.

2.1.2. Präparation von Plasmamembranen aus Pansenepithelzellen.

Die Isolierung von Zellmembranen aus dem Vormagenepithel des Rindes erfolgte anfangs nach der von Schnorr⁴¹ (in Anlehnung an Coleman) für das Vormagenepithel der Ziege angegebenen Methode. Die geringe Membranausbeute gab jedoch Veranlassung, die Präparation in der im folgenden angegebenen veränderten Form durchzuführen. Hierdurch wurde nicht nur eine deutliche Steigerung der Membranausbeute und der spezifischen Aktivität von Membranenzymen, sondern auch eine wesentliche Vereinfachung und Verkürzung des Arbeitsganges erreicht.

Nach gründlicher Säuberung der Schleimhaut mit kaltem Wasser wurde das Epithel (einschließlich des bindegewebigen Grundstocks der Zotten) mit Glasquadraten abgeschabt und in einer gekühlten 0,25 M Saccharoselösung suspendiert, die 10^{-3} Mol/L EDTA enthielt und mit 0,25 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt war.

In ein 1 Litergefäß kamen 550 ml dieser Saccharoselösung. Mit dem Epithelgeschäbssel wurde auf 900 ml aufgefüllt.

Diese Gewebssuspension wurde in ein Eisbad gestellt und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt (Sonifer, Branson Sonic Power, Modell Nr. S 75, Stufe 8). Anschließend wurde in einem 30 cm³ Glashomogenisator mit lockersitzendem Tephlonstempel nach Potter homogenisiert (3 Hübe). Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Mull filtriert, und der Filtrerrückstand in ca. 500 ml Saccharoselösung resuspendiert. Der Arbeitsgang einschließlich der Ultraschallbehandlung wurde jeweils mit dem Filtrerrückstand insgesamt drei mal wiederholt. Die Ultraschallquelle arbeitete jedoch beim dritten und vierten Präparationsschritt nur mit Stufe sechs. Außerdem wurde zum Homogenisieren ein engsitzender Tephlonstempel verwendet. Die gesammelten Filtrate wurden zehn Minuten bei 750 x g zentrifugiert (Sorvall RC2-B). Das Sediment wurde verworfen, der Überstand 30 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Die über dem gelblich-grünen Sediment stehende Flüssigkeit wurde vorsichtig dekantiert und das Sediment mit einem Handhomogenisator resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet. 35 ml- Zentrifugenbecher enthielten Saccharoselösungen folgender Dichte: 5 ml d = 1,2025; 5 ml d = 1,18; 5 ml d = 1,16; 6 ml d = 1,13 und 10 ml Membransuspension. Die Trennung im Dichtegradienten erfolgte mit einem SW 25/1 Rotor bei 25000 Upm (Rmax = 90000 x g) über 2 Stunden (präparative Ultrazentrifuge Modell L-2, Firma Beckmann). Die Fraktionen der Dichten 1,13 und 1,16 wurden getrennt gesammelt (je ca. 10 ml) und mit Tris-HCl-Puffer (0,15 M, pH 7,4) auf 80 ml verdünnt und 30 Minuten bei 30000 x g zentrifugiert (Sorvall RC2-B). Das Sediment jeder Fraktion wurde in 10 ml 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 resuspendiert und mit der gleichen Pufferlösung auf einen Proteingehalt von ca. 80 bis 100 ^{µg} eingestellt. Die membranreichen Präparationen wurden

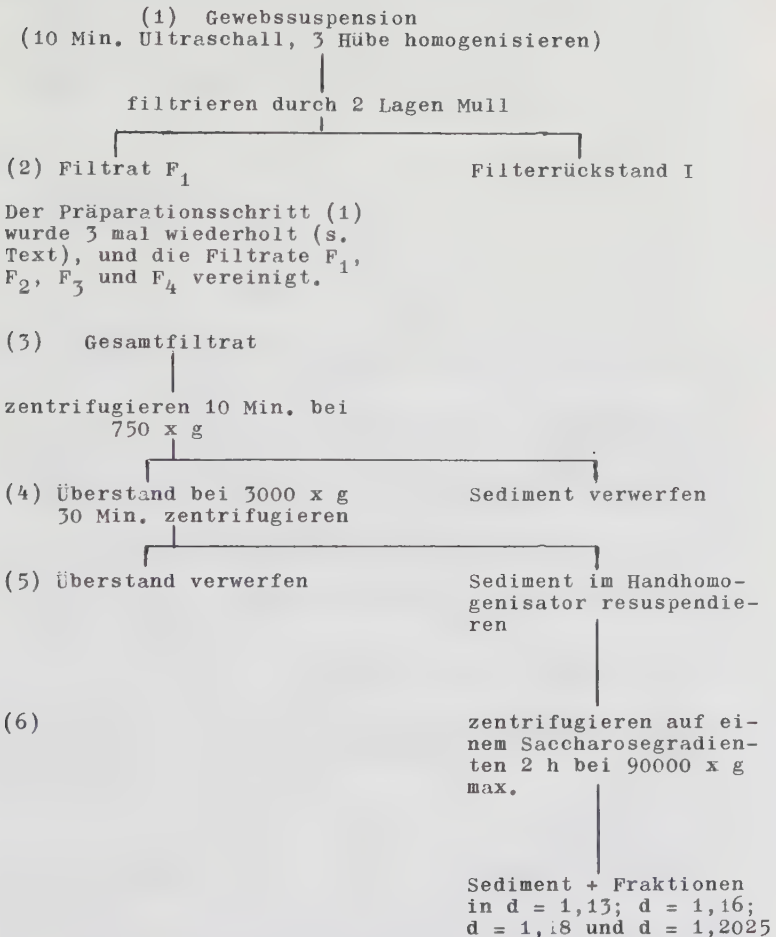
in Portionen von 1,5 ml bei -20°C aufbewahrt. Die Präparate wurden bis zu drei Wochen für die weiteren Versuche verwendet (nähere Angaben über das Alter der Präparate sind in den Ergebnissen jeweils vermerkt). Eine Übersicht über die Arbeitsgänge zeigt das Schema auf Seite 11.

2.1.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen *

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden von den Membranfraktionen der Dichte 1,13 sowie 1,16 Proben entnommen. Diese wurden 2 Minuten in der Mikrozentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und die Sedimentpfropfe in 0,05 m Glutaraldehyd in 0,1 m Cacodylatpuffer pH 7,2 eine Stunde fixiert. Nachfixiert wurde mit 1%iger Osmiumlösung pH 7,2. Nach Einbettung in Vestopal wurden die Dünnschnitte mit Uranylacetat nachkontrastiert und mit dem Elektronenmikroskop EM-9, Firma Zeiss, untersucht.

* Die elektronenmikroskopischen Kontrollen wurden von Priv. Doz. Dr. B. Schnorr am Veterinär-Anatomischen Institut hergestellt.

Präparationsschema:



2.2. Enzymatische Methoden

2.2.1. Die Bestimmung der ATPasen (ATP-Phosphohydrolasen E.C. 3.6.1.3.) erfolgte in Anlehnung an Emmelot und Bos (43).

1,3 ml Inkubationsansatz enthielten (Endkonzentration):
150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4
3 mM ATP

2.2.1.1. Die $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Mg}^{++}$ -ATPase wurde in Ansätzen von 1,3 ml bestimmt mit einer Endkonzentration von:

7,5 mM MgCl_2 , 104 mM NaCl, 24 mM KCl.

Um das Maximum der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -aktivierbaren Mg^{++} -ATPase zu ermitteln, wurden sowohl K^+ als auch Na^+ gegenläufig variiert (s. Ergebnisse).

Im folgenden wird die Ouabain-hemmbar, $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -aktivierbare Mg^{++} -ATPase als $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase bezeichnet. Sie repräsentiert die Differenz zwischen Mg^{++} -aktivierbarer Grundaktivität und $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Mg}^{++}$ -Gesamtaktivität.

2.2.1.2. Das korrespondierende Medium der $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Mg}^{++}$ -ATPase enthielt, um den Einfluß der Ionenstärke zu prüfen, 7,5 mM MgCl_2 und 128 mM KCl.

2.2.1.3. Der Inkubationsansatz der Mg^{++} -ATPase enthielt 7,5 mM MgCl_2 .

Um das Maximum der Mg^{++} -ATPase zu ermitteln, wurde die MgCl_2 -Konzentration von 10^{-6} m bis 10^{-1} m variiert.

2.2.1.4. Zur Bestimmung des Maximums der Ca^{++} -ATPase wurde CaCl_2 in Konzentrationen von 10^{-6} m bis 10^{-1} m geprüft. Die Reaktion wurde mit 0,2 ml Membranen gestartet. Wenn nicht bei den Ergebnissen besonders erwähnt, wurden bei den ATPasen ca. 20 μg Protein eingesetzt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C unter ständigem Schütteln wurde mit 0,1 ml 50%iger eisgekühlter Tri-

chloressigsäure gestoppt. Die Reaktionsgefäße kamen sofort ins Eisbad (0° bis 4°C). Nach Zentrifugation (1 Min., Tischzentrifuge Eppendorf) erfolgte unmittelbar anschließend die Bestimmung des freigesetzten Pi. Kontrollansätze enthielten Plasmamembranen sowie ATP₃ um endogenes Substrat und Spontanhydrolyse zu bestimmen.

2.2.2. Die Bestimmung der 5'-Nucleotidase (5'-Ribonucleotid-Phosphohydrolase E.C. 3.1.3.5.) erfolgte nach R.H. Michel und J.N. Hawthorne⁴⁴.

2.2.3. Inosindiphosphatase (Nucleosid-di-phosphat Phosphohydrolase E.C. 3.6.1.6.) wurde mit Guanosin-5'-di-phosphat als Substrat nach G.W.E. Plaut⁴⁵ bestimmt.

2.2.4. Saure- und alkalische Phosphatase (Orthophosphomonoester-Phosphohydrolase E.C. 3.1.3.2. und E.C. 3.1.3.1.) wurde nach R. Gianetto und C. De Duve⁴⁶ bestimmt.

2.2.5. Die Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase (D-Glucose-6-Phosphat Phosphohydrolase E.C. 3.1.3.9.) erfolgte nach A.E. Harper⁴⁷.

2.2.6. Succinatdehydrogenase (Succinat-Oxidoreductase E.C. 1.3.99.1.) wurde mit INT (2-(4-Jodphenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Tetrazoliumchlorid) als Substrat nach R.J. Pennington⁴⁸ bestimmt.

2.2.7. Der Nachweis der β -Glucuronidase (β -D-Glucuronid-Glucuronhydrolase E.C. 3.2.1.31.) erfolgte nach W.H. Fishman⁴⁹.

Bei den unter 2.2.2. bis 2.2.7. genannten Enzymen wurden ca. 10 μ g Protein pro Enzymansatz eingesetzt. Alle Enzymbestimmungen waren an das Mikrolitersystem "Eppendorf" adaptiert.

2.3. Chemische Methoden

2.3.1. Protein wurde nach Folin⁵⁰ modifiziert nach Lowry et al.⁵¹ bestimmt.

2.3.2. Die Analyse von anorganischem Phosphat (Pi) erfolgte teils nach Schröder, Horn, Böhring⁵² und teils nach Chen,¹⁰⁰ modifiziert nach Bruce et al.⁵³ (nähere Angaben s. Ergebnisse).

2.4. Statistische Berechnungen

Mittelwert $\bar{x}$ und einfache Streuung s wurden nach den Formeln

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

berechnet.

Signifikanzberechnungen erfolgten nach dem t-Test.

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{s} \times \sqrt{\frac{N_A \times N_B}{N_A + N_B}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_A^2 - \frac{(\sum x_A)^2}{N_A} + \sum x_B^2 - \frac{(\sum x_B)^2}{N_B}}{N_A + N_B - 2}}$$

Die entsprechenden p-Werte wurden den Geigy-Tabellen entnommen.

3. Verwendete Chemikalien und Reagentien

Substanz	Firma
Saccharose (D.) DAB 7	Merck
Na- β -glycerophosphat	"
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	"
Harnstoff	"
ATP (adenosin-5'-Triphosphat, Di-Natriumsalz $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Boehringer
AMP (Adenosin-5'-Monophosphat, krist., Di-Natriumsalz $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	"
Glucose-6-Phosphat	"
INT (2-(4- Jodphenyl)-3-(4- Nitrophenyl)-5-Tetrazoliumchlorid)	Fluka
Na-Succinat	"
DIMEA (2-Dimethylamino-aethylamin)	"
GDP (Guanosin-5'-diphosphat, Li- β -Salz)	Serva
Jodacetamid	"
L-Methionin	"
PCMP (Parachlormercuribenzoessäure, Natriumsalz)	Roth
NEM (N-Aethyl-Maleinimid)	Roche
Etacrynsäure	Sharp u. Dohme
Ouabain (krist. DAB 6)	Schuchardt
Phenolphthalein-Glucuronid	Cal. Biochem.

Alle verwendeten Chemikalien und Reagentien hatten
p.A. Qualität.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Präparation

4.1.1. Isolierung von Plasmamembranen

Nach den Angaben in der Methode bestand das Ausgangsmaterial (Epithelgeschabsel) im wesentlichen aus Pansenzotten unterschiedlicher Größe und Form aus dem haubenseitigen Teil des dorsalen Endblindsackes des Pansens (Schleudermagen). Nach der Definition von B. Schnorr und B. Vollmerhaus⁵⁴ handelt es sich dabei zum größten Teil um blattförmige Zotten, deren Körper 2 bis 7 mm breit, bis 20 mm hoch und 0,5 mm dick ist. Gelegentlich ist der beschriebene Zottentyp im Grund des Schleudermagens durch bandförmige Zotten ersetzt.

Durch die Ultraschallbehandlung und das Homogenisieren wird nach früheren Untersuchungen (Schnorr⁴¹) der Epithelzellverband vom Bindegewebsstock gelöst. Gleichzeitig kommt es zum Aufschluß der vitalen Zellen aus den tiefen Epithelschichten (Stratum basale, Stratum spinosum profundum, Stratum spinosum superficiale), während die Keratohyalinkörner enthaltenden Zellen des Stratum granulosum und die verhornten Zellen des Stratum corneum durch die Ultraschallbehandlung und das Homogenisieren nicht zerstört werden. Im Filtrerrückstand (Schritt 2) verbleiben im wesentlichen größere, nicht aufgeschlossene Epithelzellverbände sowie Bindegewebe. Nach Schritt 3 erscheinen im Sediment (750 x g) mehr oder weniger intakte Zellen aus verschiedenen Epithelschichten sowie Bindegewebsfasern, die den Filter passiert haben, und Zellkerne der aufgeschlossenen tiefen Zellschichten. Im Überstand (Schritt 4) verbleiben Zellmembranen verschiedener Größe, Mitochondrien, Mikrosomen, Lysosomen und Keratohyalinkörner. Nach Schritt 4 (3000 x g) werden im wesentlichen

Plasmamembranen sedimentiert. Hinzu kommen Verunreinigungen durch vereinzelte größere Mitochondrien, vereinzelte Kerntrümmer sowie feinere Bindegewebsfasern. Der Überstand (Schritt 4) enthält Lysosomen, Mikrosomen und Mitochondrien und wird verworfen. Das membranreiche Sediment, bezeichnet als "Ausgangshomogenat", sowie die im Dichtegradienten getrennten Fraktionen wurden anhand der bekannten biochemischen Kriterien für Leitenzyme von Membranen und subzellulären Partikeln analysiert (Emmelot et al.⁴³).

Die Anreicherung von Plasmamembranen sowie die relative Verunreinigung mit subzellulären Partikeln wurde auf die spezifische Aktivität dieser Leitenzyme bezogen (s. Tabelle 1 und 2, S. 18). Als Leitenzyme für Plasmamembranen wurden bestimmt:

ATPasen (E.C. 3.6.1.3.), Inosindiphosphatase (E.C. 3.6.1.6), 5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5.) und alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1.).

Die prozentuale Verunreinigung mit Mitochondrien ergab sich aus der Messung von Succinatdehydrogenase (E.C. 1.3.99.1.). Für Mikrosomen (Endoplasmatisches Reticulum) wurde Glucose-6-Phosphatase (E.C. 3.1.3.9.) und für Lysosomen saure Phosphatase (E.C. 3.1.3.2.) bzw. B-Glucuronidase (E.C. 3.2.1.31.) als Indikatorenzym gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 1 und 2 S. 18 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Leitenzyme für Plasmamembranen

I = spezifische Aktivität, II = Anreicherung, III = Ausbeute bzw. Verunreinigung

Fraktion →	A.H.	1,13			1,16			1,18			1,2025		
Enzym ↓	I	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Mg ⁺⁺ -ATPase	17,264	28,01	1,62	6,36	34,79	2,02	11,03	13,01	0,75	3,86	5,60	0,32	1,55
Mg ⁺⁺ -K ⁺ -ATPase	16,950	28,29	1,67	6,52	33,90	2,00	10,00	10,68	0,63	3,23	6,29	0,37	1,77
Mg ⁺⁺ -K ⁺ -Na ⁺ -ATPase	22,063	31,76	1,44	5,67	38,71	1,79	9,66	13,01	0,37	3,04	7,34	0,33	1,60
IDPase	59,680	60,19	1,01	3,00	76,05	1,27	6,89	40,92	0,69	3,47	11,08	0,19	0,88
5'-Nucleotidase	43,750	74,50	1,00	6,53	88,03	2,01	10,76	39,51	0,90	4,53	14,25	0,33	1,53
Alkalische Phosphatase	0	0			0			0			0		

Tabelle 2: Leitenzyme für subzelluläre Verunreinigungen

		0,22	0,32	1,25	0,21	0,30	1,63	0,17	0,25	1,29	0,14	0,21	0,98
Succinatdehydrogenase	0,680	0,22	0,32	1,25	0,21	0,30	1,63	0,17	0,25	1,29	0,14	0,21	0,98
Saure Phosphatase	3,084	3,95	1,28	5,31	5,64	1,83	14,72	3,44	1,12	7,34	1,34	0,43	3,85
β-Glucuronidase	0,540	0,14	0,25	1,06	0,91	1,68	13,54	0,49	0,91	5,97	0,26	0,49	4,32
Glucose-6-Phosphatase	0	0			0			0			0		

Zu Tabelle 1 und 2:

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\bar{x}$ von Doppelbestimmungen einer Membranpräparation. Als "Ausgangshomogenat" wurde aus meßtechnischen Gründen die Suspension bezeichnet, die auf den diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet wurde. Zur Bestimmung der alkalischen und sauren Phosphatase, sowie der β -Glucuronidase als latente, partikelgebundene Enzyme, wurden die Fraktionen sechs mal gefroren und wieder aufgetaut.

Die spezifische Aktivität der Phosphat abspaltenden Enzyme wurde in μ Mol freigesetztes P_i /mg Protein/h angegeben, die spezifische Aktivität der Succinatdehydrogenase in μ Mol umgesetztes Substrat/mg Protein/h und die der β -Glucuronidase in μ Mol freigesetztes Phenolphthalein/mg Protein/h. Der Anreicherungsfaktor bezogen auf das nicht im Gradienten aufgetrennte Material wurde als Quotient

$$\frac{\text{spez. Akt. der jeweiligen Fraktion}}{\text{spez. Akt. des Ausgangshomogenats}}$$

ausgedrückt. Ausbeute und Verunreinigung sind angegeben in Prozent, bezogen auf das Ausgangshomogenat.

A.H. = Ausgangshomogenat

Für die Untersuchungen wurden Membranen benutzt, die bei -20°C aufbewahrt wurden und ca. eine Woche alt waren. Trotz des Einsatzes der vierfachen Proteinmenge (vgl. S. 9) zur Inkubation konnte die alkalische Phosphatase als ein Leitenzym für Plasmamembranen und das Leitenzym für Mikrosomen, Glucose-6-Phosphatase in den gemessenen Präparaten nicht nachgewiesen werden.

Die elektronenmikroskopischen Kontrollen der Membranfraktionen $d = 1,13$ und $d = 1,16$ sind in Abbildung 1 und 2 dargestellt.

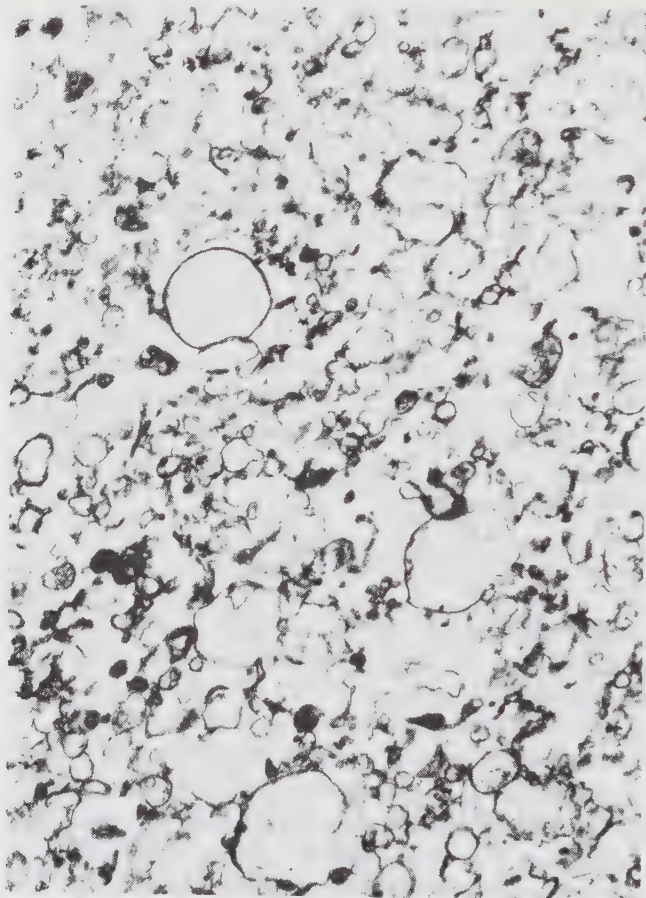


Abb. 1 Membranen der Dichte 1,13.
Vergrößerung: 22500-fach
(nähere Angaben s. Methoden 2.1.3. S. 10)

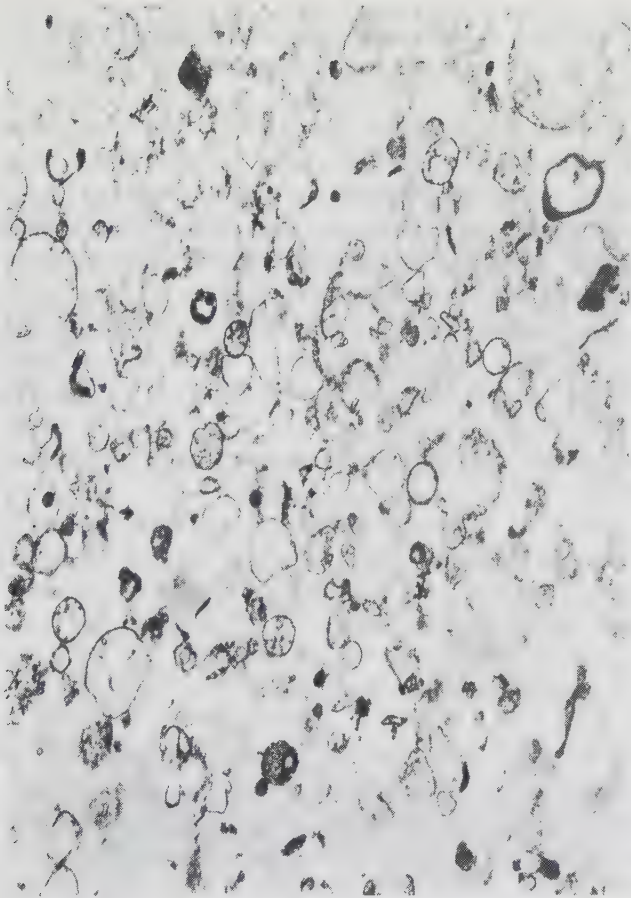


Abb. 2 Membranen der Dichte 1,16
Vergrößerung: 22500-fach
(nähere Angaben s. Methoden 2.1.3. S. 10)

Die Abbildungen zeigen, daß die Präparationen vorzugsweise aus unterschiedlich großen Membranstücken, die teilweise eingerollt sind, und aus vesikulären Membrananschnitten unterschiedlicher Größe bestehen. Bei Übersichtsaufnahmen sind vereinzelt Mitochondrien und Lyso-

somen zu erkennen. Außerdem sind Granula höherer Elektronendichte, vermutlich Keratohyalinkörner, darstellbar.

Aus den Tabellen 1 und 2 geht hervor, daß in der Fraktion $d = 1,16$ des Dichtegradienten die höchsten spezifischen Aktivitäten für Plasmamembranenzyme vorkommen. Bezogen auf das Gesamthomogenat ergaben sich Anreicherungsfaktoren, die durchschnittlich um 2 liegen. Die prozentuale Verunreinigung mit Mitochondrien, gemessen an der spezifischen Aktivität von Succinatdehydrogenase, beträgt 1,6 %, mit Lysosomen, gemessen an saurer Phosphatase bzw. β -Glucuronidase, beträgt sie 14 %. Das Leitenzym für Mikrosomen, Glucose-6-Phosphatase, ist nicht nachweisbar.

Die Ausbeute an Plasmamembranen für diese Fraktion, bezogen auf das Ausgangshomogenat, war mit ca. 10 % am höchsten. Auf Grund der biochemischen und elektronenoptischen Kriterien wurden für die folgenden Messungen im wesentlichen Membranpräparationen aus der Dichte $d = 1,16$ verwendet.

Die durchschnittliche Membranausbeute, bezogen auf den Proteingehalt, betrug für diese Fraktion ca. 4,0 mg pro 100 g Naßgewicht des Epithelgeschabsels. Insgesamt wurden 33 verschiedene Präparationen durchgeführt.

4.1.2. Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der Mg^{++} -ATPase und der $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase von der eingesetzten Enzymmenge.

Um einige biochemische Eigenschaften der durch mono- und divalente Kationen aktivierbaren ATPasen näher zu untersuchen, war es zunächst notwendig zu prüfen, in welchem Bereich die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration linear verläuft.

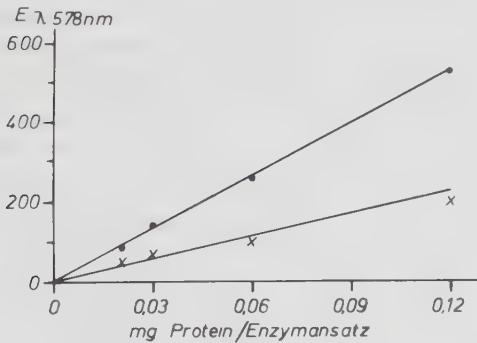


Abb. 5: Abhängigkeit der Mg^{++} - und $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase von der eingesetzten Proteinkonzentration.

Abszisse: mg Protein/ Enzymsatz.

Ordinate: $E_{\lambda} = 578 \text{ nm}$. Inkubationsansatz:

1,3 ml. Tris-HCl-Puffer pH 7,4 150 mM, ATP 3 mM, $MgCl_2$ 7,5 mM, NaCl 104 mM, KCl 24 mM. Inkubationszeit: 20 Min. bei $37^{\circ}C$.

Mg^{++} -ATPase = x — x,

$Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase = • — •.

Die Abbildung 3 zeigt, daß die Enzymaktivität gemessen an der Mg^{++} - und der $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -abhängigen ATP-Hydro-

lyse in dem untersuchten Bereich von 0,02 bis 0,12 mg Protein pro Meßansatz weitgehend linear verläuft. Nach diesem Befund wurden für alle weiteren Untersuchungen ca. 20 ~~µ~~g Protein für jede Enzymbestimmung eingesetzt.

4.1.3. Verhalten der spezifischen Aktivitäten der ATPasen (E.C. 3.6.1.3.) während des Alterungsprozesses unter verschiedenen Bedingungen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die spezifischen Enzymaktivitäten von Membran-ATPasen verschiedener Herkunft bezüglich der Alterung (Aufbewahrung bei niedrigen Temperaturen), sowie gegen Einfrieren und Auftauen unterschiedliches Verhalten zeigen (Evans⁵⁶, Lindenmeyer⁵⁷, Schwartz⁵⁸, 59, Auditore⁶⁰). Für die vorliegenden Untersuchungen war diese Frage aus folgenden Überlegungen bedeutsam:

1. Über welchen Zeitraum kann eine Präparation für eine Versuchsserie ohne wesentliche Enzyminaktivierung verwendet werden.
2. Besteht die Möglichkeit, mehrere Membranpräparationen als Ausgangsmaterial für spätere Anreicherungs- bzw. Isolierungsversuche der Enzymsysteme zu sammeln.

Für diese Experimente wurde die Membranausbeute einer Präparation unter drei verschiedenen Bedingungen aufbewahrt: Ein Drittel wurde, wie bei den Methoden (2.1.2.) angegeben, in Portionen von ca. 1,5 ml eingefroren, bei -20°C aufbewahrt. Nach verschiedenen Zeiten wurde die jeweils benötigte Membranmenge aufgetaut. Die Aufbewahrung des zweiten Drittels erfolgte ebenfalls in Portionen, jedoch bei Kühlraumtemperatur von ca. +4°C. Der Rest, ca. 20 ml, wurde in einem größeren Gefäß bei -20°C eingefroren. Für jeden Versuch wurde diese gesamte Membranmenge aufgetaut, und eine Meßprobe entnommen.

Im folgenden werden diese Versuchsreihen mit I, II und III bezeichnet.

Die Messungen der Enzymaktivitäten erfolgten über einen Zeitraum von insgesamt 24 Tagen. Die erste Messung fand ca. 12 Stunden nach der Präparation statt. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 4 bis 8.

Abb. 4 bis 7: Verhalten der spezifischen Aktivitäten der ATPasen beim Alterungsprozeß unter verschiedenen Bedingungen.

Inkubationsansatz: 1,3 ml enthielten 7,5 mM $MgCl_2$, 24 mM KCl, 104 mM NaCl, 3 mM ATP und 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4.

Versuchsreihe I = • ——— •

Versuchsreihe II = x ——— x

Versuchsreihe III = o ——— o

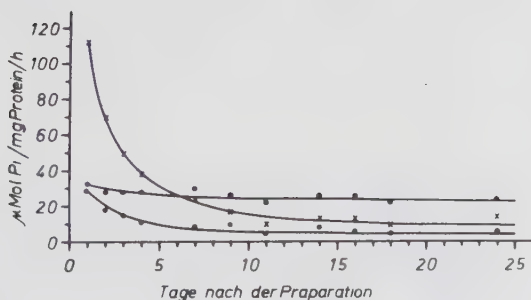


Abb. 4: Mg^{++} -ATPase.

Abszisse: Tage nach der Präparation

Ordinate: Spez. Akt. in μ Mol Pi/mg Protein/h.

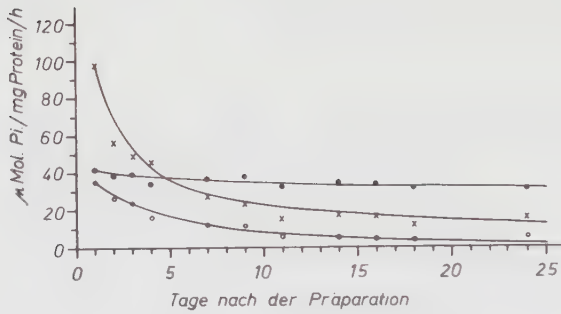


Abb. 5: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$

Abszisse: Tage nach der Präparation

Ordinate: Spez. Akt. in μ Mol Pi/mg Protein/h.

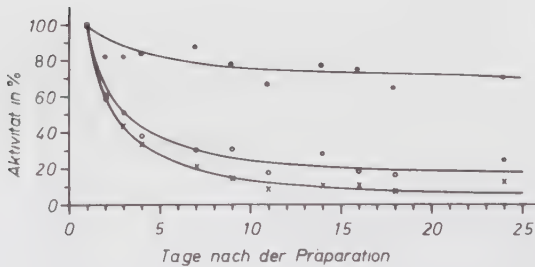


Abb. 6: $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$

Abszisse: Tage nach der Präparation

Ordinate: Aktivität in Prozent der am 1. Tag
gemessenen spez. Akt. (= 100 %).

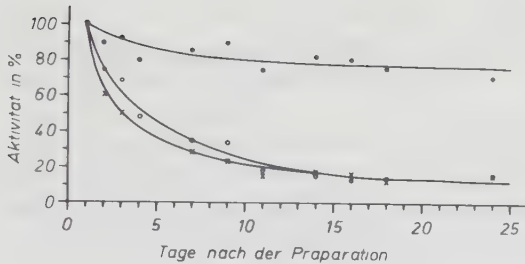


Abb. 7: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$

Abszisse: Tage nach der Präparation

Ordinate: Aktivität in Prozent der am 1. Tag
gemessenen spez. Akt. (= 100 %).

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen überraschend, daß ca. 12 Stunden nach der Präparation die spezifische Aktivität der $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ sowie der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ der Versuchsreihe II (Aufbewahrung bei $+4^\circ\text{C}$) gegenüber den Versuchsreihen I und III 3 bis 4- bzw. 2 bis 3fach höher ist. Das heißt: Bereits einmaliges Einfrieren und wieder Auftauen der Enzympräparate (I und III) führt somit zu einer erheblichen Abnahme der spezifischen Aktivität. Die weitere Lagerung der Membranpräparation bei $+4^\circ\text{C}$ (Versuchsreihe II) führt in den darauf folgenden Tagen zu einer raschen, nahezu exponentiellen Abnahme der spezifischen Aktivität, so daß am 3. Tag nur noch 50 %, gegen Versuchsende am 24. Tag nur noch ca. 10 % der Ausgangsaktivität nachweisbar sind. Am günstigsten erweist sich die Lagerung der Präparation bei -20°C (Versuchsreihe I).

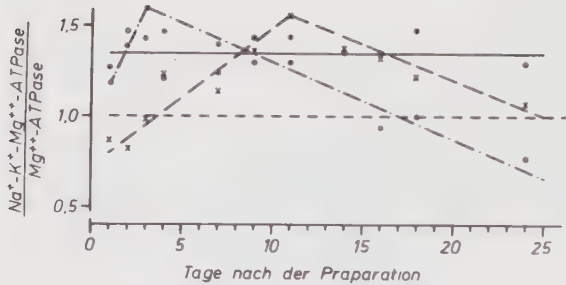


Abb. 8: Verhalten des Quotienten $\frac{\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Mg}^{++}-\text{ATPase}}{\text{Mg}^{++}-\text{ATPase}}$ im Verlauf der Alterung.

Abszisse: Tage nach der Präparation

Ordinate: Quotient $\frac{\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Mg}^{++}-\text{ATPase}}{\text{Mg}^{++}-\text{ATPase}}$

Inkubationsansatz: 1,3 ml enthielten 7,5 mM MgCl_2 , 24 mM KCl, 104 mM NaCl, 3 mM ATP und 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4

Versuchsreihe I = • ————— •

Versuchsreihe II = x - - - - x

Versuchsreihe III = o - • - ◻ - o

Es kommt zwar zu einem initialen erheblichen Verlust der spezifischen Aktivität, Lagerung über 25 Tage bewirkt jedoch lediglich einen weiteren Abfall um 10 bis 30 %. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren des Enzyms führt trotz Lagerung bei -20°C (Versuchsreihe III) zu einer raschen Inaktivierung.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß eine längere Lagerung bei -20°C (Versuchsreihe I) die bisher einzige Möglichkeit darstellt, die Enzymaktivität über einen großen Zeitraum zu erhalten. Für größere Versuchsreihen von einer Präparation wurden daher ausschließlich Enzympräparate der Versuchsreihe I benutzt.

Für ATPase-Präparationen, zum Beispiel Mikrosomen aus Gehirn und Muskelzellmembranen (Lindenmeyer⁵⁷, Schwartz^{58,59}, Auditore⁶⁰, Dransfeld⁶¹) ist bekannt, daß die Mg^{++} -aktivierbare ATPase durch Alterung schneller inaktiviert, als die $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -aktivierbare Mg^{++} -ATPase. Daraus resultiert ein kontinuierlicher Anstieg des

Quotienten $\frac{\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}}{\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}}$ in Abhängigkeit von der

Alterung. Dieses Verfahren wird angewendet, um höhere spezifische Aktivitäten für die $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -aktivierbare Mg^{++} -ATPase zu erzielen. Abbildung 8 zeigt, daß der

Quotient $\frac{\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}}{\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}}$ für die Versuchsreihe I

über die Versuchsdauer konstant bleibt. Bei frisch präparierten Membranen (Versuchsreihe II, 1 bis 3 Tage alt) ist der Quotient kleiner als 1, d.h., die Anwesenheit von Na^{+} und K^{+} bewirkt keine Steigerung der ATP-Hydrolyse. Eine $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase ist unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar. (Schwartz⁵⁸, Mozsik⁶³) Nach Alterung (Aufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$) steigt der Quotient im Verlauf von 4 bis 11 Tagen weitgehend linear an. Weitere Alterung der Membranpräparation bewirkt zunehmende Inaktivierung der $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase. Zum Zeitpunkt des Maximums beträgt die spezifische Aktivität sowohl der Mg^{++} -ATPase als auch der $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase nur ca. 10 bis 20 % der Ausgangsaktivität und beträgt für beide Enzyme nur 60 % der spezifischen Aktivität von Versuchsreihe I. Der Quotient der Versuchsreihe III erreichte

bereits am 3. Tag sein Maximum. Die Abnahme des Quotienten verläuft von diesem Zeitpunkt an wie bei Versuchsreihe II. Gegen Versuchsende tritt durch Na- und K-Ionen sogar eine Hemmung der Mg^{++} -ATPase ein. Zum Zeitpunkt des Maximums (3. Tag) betragen die spezifischen Aktivitäten (Mg^{++} -ATPase und $Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase) jedoch nur noch ca. 50 bis 60 % verglichen mit Versuchsreihe I.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die für Versuchsreihe I beschriebenen Bedingungen der Aufbewahrung über den geprüften Zeitraum reproduzierbare Aktivitäten, gemessen am $\frac{Na^+-K^+-Mg^{++}-ATPase}{Mg^{++}-ATPase}$ Quotient ergeben.

4.2. Abhängigkeit der ATPasen (E.C. 3.6.1.3.) von der Ionenkonzentration.

4.2.1. Mg^{++} -ATPase

Für Plasmamembranen von erregbaren und nicht erregbaren Zellen sind für die Mg^{++} -stimulierbare ATPase unterschiedliche Mg^{++} -Konzentrationen optimal. In der Literatur wird die optimale Mg^{++} -Konzentration als Quotient

$\frac{Mg^{++}\text{-Konzentration}}{ATP\text{-Konzentration}}$ angegeben. Skou^{6,11} und Dunham⁶²

fanden in Gegenwart von Na^+ und K^+ ein optimales Mg^{++} -ATP-Verhältnis von 2 : 1. Andere Autoren (Auditor⁶⁰, Smith⁶⁴, Allin⁶⁵, van Os⁶⁶) fanden in Gegenwart von Mg^{++} allein eine maximale Aktivierung der Mg^{++} -ATPase bei einem Mg^{++} -ATP-Verhältnis von 1 : 1.

In Abbildung 9 (S. 31) ist die ATP-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration dargestellt. Geprüft wurden Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-1} Mol/L. Aus den Versuchen geht hervor, daß ein molares Verhältnis von 2,5 : 1 bezogen auf Mg^{++} -Konzentration : ATP-Konzentration optimal ist.

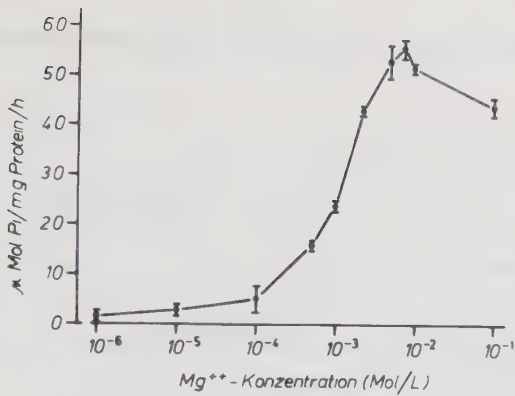


Abb. 9: Einfluß verschiedener Mg^{++} -Konzentrationen auf die Aktivität der Mg^{++} -stimulierten ATPase.

Ordinate: Spez. Akt. in μ Mol Pi/mg Protein/h
 Abszisse: Endkonzentrationen von Mg^{++} im Inkubationsmedium, aufgetragen im logarithmischen Maßstab. Alter der Membranen: 3 Tage. Die Ergebnisse stellen Mittelwert $\bar{x} \pm 1s$ von 8 bis 12 Bestimmungen aus einer Präparation dar. Das anorganische Phosphat wurde nach Schröder, Horn, Böhring⁵² bestimmt.

4.2.2. Ca^{++} -ATPase

Für eine Reihe von Zellsystemen wird ein aktiver Transport von Ca^{++} postuliert (Stam²², Borle²³, Schatzmann²⁴, Manery²⁶, Albers¹³), der abhängig ist von einer Ca^{++} -aktivierten ATPase. Dabei wird die Frage diskutiert, daß es sich hier möglicherweise um den gleichen Enzymkomplex wie für die $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase mit verschiedener Affinität für bivalente Ionen (Borle²³, Ohtsuki²⁷, Manery²⁶) handelt. Für das vorliegende Enzympräparat aus Pansenepithel wurde geprüft, ob eine Ca^{++} -aktivierbare ATPase nachweisbar ist, und ob in der konzentrationsabhängigen

Aktivierung zwischen Mg- und Ca-Ionen Unterschiede bestehen.

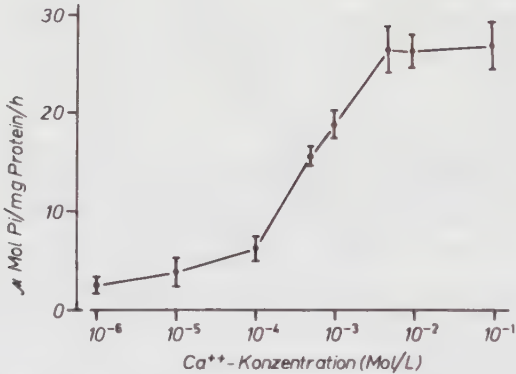


Abb. 10: Einfluß verschiedener Ca⁺⁺-Konzentrationen auf die Aktivierung der Ca⁺⁺-stimulierten ATPase.

Abszisse: Endkonzentrationen von Ca⁺⁺ im Inkubationsmedium, aufgetragen im logarithmischen Maßstab. Membranen: 3 bis 7 Tage alt.

Ordinate: Spez. Akt. in μ Mol Pi/mg Protein/h. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte $\bar{x} \pm 1s$ von 8 Bestimmungen aus einer Präparation dar. Das anorganische Phosphat wurde nach Schröder, Horn, Böhring⁵² bestimmt.

Aus dem Diagramm der Abbildung 10 geht hervor, daß Konzentrationen von 10⁻⁶ bis 10⁻¹ Mol/L CaCl₂ im Inkubationsmedium eine Aktivierung der ATP-Hydrolyse bewirken. Die optimale Konzentration für die Ca⁺⁺-ATPase beträgt dabei 5 × 10⁻³ bis 10⁻¹ Mol/L. Der Verlauf der Aktivierungskurve zeigt bei niedrigen Ca⁺⁺- bzw. Mg⁺⁺-Konzentrationen jedoch deutlich unterschiedliches Verhalten zur Mg⁺⁺-ATPase (Abb. 9).

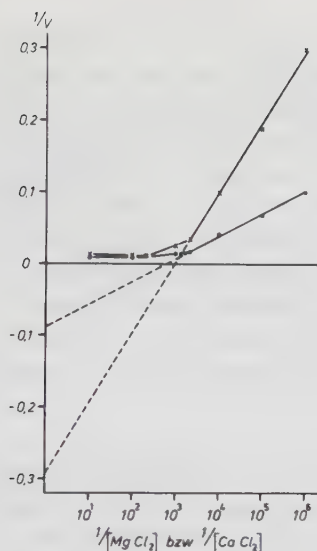


Abb. 11: Wirkung von Mg^{++} und Ca^{++} auf die ATP-Hydrolyse

Die Werte sind nach Lineweaver-Burk aufgetragen.

Ca^{++} -ATPase = • ——— •

Mg^{++} -ATPase = x ——— x

In Abbildung 11 wurden die gefundenen Meßwerte (Mg^{++} -ATPase und Ca^{++} -ATPase) nach Lineweaver-Burk aufgetragen. Aus der Abbildung geht hervor, daß im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-3} Mol/L die Kinetik der Michaelis-Menden-Beziehung weitgehend folgt, und daß Mg-Ionen die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse um einen Faktor 3 gegenüber Ca-Ionen steigern.

4.2.3. Na^+ - K^+ -aktivierbare Mg^{++} -ATPase

Aus dem Versuch Abbildung 9 (S. 31) geht hervor, daß die optimale Mg^{++} -Konzentration für die Mg^{++} -stimulierbare ATPase 7,5 mM pro Ansatz beträgt. Im folgenden wurde geprüft, welche Na^+ - bzw. K^+ -Konzentrationen für die Na^+ - K^+ -ATPase optimal sind. Dabei wurden bei konstanter Mg^{++} -Konzentration (7,5 mM) die Konzentrationen der monovalenten Ionen Na^+ und K^+ im Inkubationsmedium variiert. Für diese Versuche wurde die Na^+ -Konzentration bzw. die K^+ -Konzentration derart geändert, daß mit ansteigendem K^+ -Gehalt der Na^+ -Gehalt vermindert wurde, so daß die Ionenstärke für jeden Inkubationsansatz konstant blieb.

In das Diagramm der Abbildung 12 (S. 35) wurde die Aktivierung der Mg^{++} -Grundaktivität (Mg^{++} -ATPase) durch Na^+ und K^+ eingetragen (d.h.: Na^+ - K^+ - Mg^{++} -ATPase minus Mg^{++} -ATPase). Aus der Abbildung geht hervor, daß die Na^+ - K^+ - Mg^{++} -ATPase in Abhängigkeit von der Na^+ - und K^+ -Konzentration zwei Maxima aufweist. Ein Aktivierungsoptimum liegt bei 24 mM KCl und 104 mM NaCl (Na^+ - K^+ -ATPase II). Ein zweites Optimum ergibt sich bei Konzentrationen von 56 mM KCl und 72 mM NaCl (Na^+ - K^+ -ATPase I). Bei Anwesenheit von 48 mM KCl und 80 mM NaCl im Inkubationsmedium ergibt sich ein zwischen diesen beiden Optima meßbares Minimum. Zwischen diesem Minimum und den beiden Maxima wurde Signifikanz bestimmt. Die daraus folgenden P-Werte betragen:

Für das Maximum bei 24 mM KCl $0,0005 < P < 0,0025$,
für das Maximum bei 56 mM KCl $0,0025 < P < 0,005$.

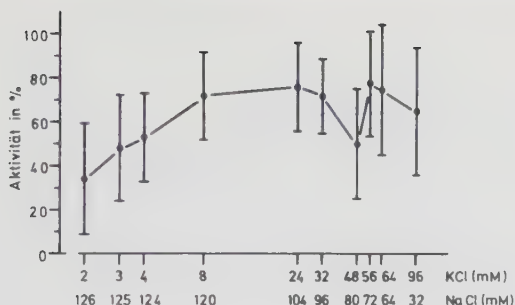


Abb. 12: Einfluß verschiedener Na^+ - und K^+ -Konzentrationen auf die Aktivität der Mg^{++} -stimulierbaren ATPase.

Abszisse: Endkonzentrationen des Na^+ - und K^+ -Zusatzes in den Enzymanalysen im logarithmischen Maßstab.

Ordinate: Aktivität in Prozent, bezogen auf die in jeder Versuchsreihe ermittelte maximale Aktivität ($\approx 100\%$).

Das Alter der Membranen lag zwischen 2 Tagen und 3 Wochen. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwert $\bar{x} \pm 1s$ von 7 bis 16 Versuchen aus 12 Präparationen. Das anorganische Phosphat wurde nach Chen¹⁰⁰, modifiziert nach Bruce⁵³, bestimmt.

4.3. Bestimmung des pH-Optimums

Bezüglich der spezifischen pH-Verhältnisse, die im Pansen der Wiederkäuer vorliegen (Dobson¹, Koch-Grub⁶⁷, Orth und Kaufmann⁶⁸), ist es von physiologischem und pathophysiologischem (Dirksen^{69,70}, Orth und Kaufmann⁶⁸, Thorbek⁷¹, Hörnicke²) sowie pharmakologischem (Dobson¹, Austin⁷², Phillipson⁷³) Interesse zu prüfen, welche pH-Optima für die Mg^{++} - sowie die $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase an isolierten Plasmamembranen des Pansenepithels vorliegen. Um den möglichen Einfluß unterschiedlicher Puffer auf die spezifische Aktivität der ATPasen auszuschließen, kam ein nach den Angaben von Semenza et al.⁷⁴ hergestellter Universalpuffer zur Anwendung. Dieses Puffersystem (s. Legende der Abb. 13 S. 37) bietet den Vorteil, daß in dem geprüften Bereich von pH 5,0 bis pH 8,0 die Puffersubstanz nicht gewechselt werden mußte.

Aus der Abbildung 13 (S. 37) geht hervor, daß sowohl für die Mg^{++} -ATPase als auch für die $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase unter den gegebenen Versuchsbedingungen gleiche pH-Optima (pH 7,0) nachweisbar sind. Auffallend ist jedoch, daß die geprüften extremen Meßpunkte für pH 5,0 und pH 8,0 noch erhebliche Enzymaktivitäten aufweisen. Bei pH 5,0 beträgt die Aktivität sowohl für die Mg^{++} - als auch für die $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase noch ca. 40 bis 50 %, bei pH 8,0 für beide ATPasen noch 70 bis 80 % der maximalen Aktivität. Für beide ATPasen ist demnach kein scharf begrenztes pH-Optimum nachweisbar.

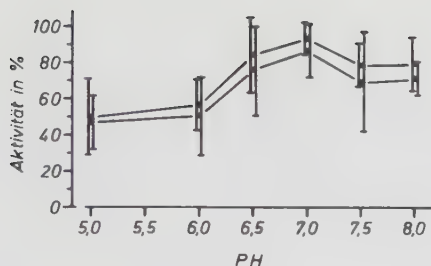


Abb. 13: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Mg^{++} - bzw. $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase vom pH-Wert des Inkubationsmediums.

Mg^{++} -ATPase = • — • , $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase = o — o
 Ordinate: Aktivität in Prozent, bezogen auf die in jeder Versuchsreihe ermittelte maximale Aktivität (= 100 %). Abszisse: pH-Wert.
 Alter der Membranen: 2 bis 10 Tage. Inkubationsansatz: a) Puffer: Zur Herstellung des Puffersystems nach Semenza wurde wie folgt verfahren: Die Ausgangslösung bestand aus 100 mMol (=8,81 g) Dimea (Dimethylamino-Äthylamin) und 70 mMol (= 8,48 g) Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan) aufgefüllt auf 500 ml mit Aqua dest.. Für jeden Meßpunkt wurden 50 ml dieser Ausgangslösung mit 1 n HCl auf den in Abb. 13 angegebenen pH-Wert eingestellt. Dann wurde mit Aqua dest. so verdünnt, daß die Endkonzentration im Inkubationsansatz sowohl für Dimea als auch für Tris 150 mM betrug. Die dem Inkubationsansatz zuzufügenden Ionen und das ATP wurden entsprechend dem Meßpunkt in dem jeweiligen Puffer gelöst. Angesetzt waren Puffer für die Punkte pH = 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0. Im Inkubationsmedium wurde nach Zugabe von ATP jeweils eine pH-Kontrolle durchgeführt. b) Ionen: 7,5 mM MgCl_2 , 24 mM KCl, 104 mM NaCl, 2 mM ATP. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwert $\bar{x} \pm 1s$ von 4 bis 5 Doppelbestimmungen aus zwei Präparationen. Pi nach Chen¹⁰⁰.

4.4. Spezifische Aktivitäten der Mg^{++} - und Na^+-K^+ - Mg^{++} -ATPase von Plasmamembranen aus Pansenepithelzellen.

Unter optimalen Versuchsbedingungen hinsichtlich pH-Wert und Ionenzusammensetzung bzw. -konzentration in den Inkubationsansätzen ergeben sich für Plasmamembranen, die bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt wurden (Versuchsreihe I), die in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßten spezifischen Aktivitäten.

Tabelle 3: Spezifische Aktivitäten der ATPasen

Enzym	Spez. Akt. $\mu\text{Mol Pi}/\mu\text{g/h}$		$\text{mM } K^+ / \text{mM } Na^+$	% der Gesamtaktivität
Mg^{++} -ATPase	24,97 $\pm$	9,57		
$Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase I	52,27 $\pm$	9,14	64/64	
$Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase II	35,04 $\pm$	13,76	24/104	
Na^+-K^+ -ATPase I	8,32 $\pm$	4,23	64/64	25,35 $\pm$ 11,98
Na^+-K^+ -ATPase II	9,10 $\pm$	6,90	24/104	24,70 $\pm$ 13,20

Ermittelte optimale Versuchsbedingungen (Inkubationsansatz): 1,3 ml enthielten 7,5 mM $MgCl_2$, 64 mM KCl und 64 mM NaCl (Na^+-K^+ -ATPase I, vgl. Diskussion Abb.17) bzw. 24 mM KCl und 104 mM NaCl (Na^+-K^+ -ATPase II), 3 mM ATP und 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4. Die Werte repräsentieren Mittelwert $\bar{x} \pm 1s$ von 30 Doppelbestimmungen (Mg^{++} -ATPase) bzw. 15 Doppelbestimmungen ($Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase) aus 15 verschiedenen Präparationen.

Für die $Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase sowie für die Na^+-K^+ -ATPase wurden die spezifischen Aktivitäten für beide Maxima, die sich aus dem Diagramm der Abbildung 12 S. 35 ergeben, in die Tabelle aufgenommen. Weiter ist eingetragen die durch Anwesenheit von Na^+ und K^+ aktivierbare Grundaktivität (Mg^{++} -ATPase) in Prozent der Gesamtaktivität ($Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase).

4.5. Einfluß von K^+ und Na^+ auf die Ca^{++} -ATPase

Ein wesentliches Argument, daß Ca^{++} - und Mg^{++} -ATPase zwei unterschiedliche Transportmechanismen repräsentieren, ist die Nichtaktivierbarkeit der Ca^{++} -ATPase durch Na^+ und K^+ (Skou¹¹, Stam²², Schatzmann²⁵, Auditore⁶⁰). Für zwei verschiedene Membranpräparationen wurde daher geprüft, ob die Ca^{++} -ATPase der vorliegenden Membranpräparation durch Zusatz von Na^+ und K^+ weiter aktivierbar ist. Außerdem wurde der Einfluß von Ca^{++} auf die Mg^{++} -ATPase bzw. die $Na^+-K^+-Mg^{++}$ -ATPase untersucht.

Zu Tabelle 4: Vergleich zwischen Ca^{++} - und Mg^{++} -ATPase (s. S. 40)

Die Inkubationsansätze enthielten in 1,3 ml 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 3 mM ATP. Mg^{++} -ATPase: 7,5 mM $MgCl_2$, Ca^{++} -ATPase: 5 mM $CaCl_2$, $Na^+-K^+-Mg^{++}$ - (Ca^{++} -) ATPase: 7,5 mM $MgCl_2$ (5 mM $CaCl_2$), 104 mM NaCl, 24 mM KCl.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\bar{x}$ aus zwei Doppelbestimmungen von je einer Präparation. $Na^+-K^+-ATPase$ = durch Na^+ und K^+ auf die Mg^{++} - (Ca^{++} -) ATPase aufsetzbare Aktivität in Prozent der resultierenden Gesamtaktivität. Spez. Akt. = μ Mol Pi/mg Protein/h. Pi nach Chen

Tabelle 4: Vergleich zwischen Ca^{++} -ATPase und Mg^{++} -ATPase

Präparation	Enzym	Spezifische Aktivität	% der Gesamtkativität
I	Mg^{++} -ATPase	23,238	27,5 0
	Ca^{++} -ATPase	20,645	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase	32,111	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Ca}^{++}$ -ATPase	19,450	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase (Mg^{++})	8,873	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase (Ca^{++})	—	
II	Mg^{++} -ATPase	36,737	32,5 0
	Ca^{++} -ATPase	35,259	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase	54,458	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Ca}^{++}$ -ATPase	34,328	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase (Mg^{++})	17,721	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase (Ca^{++})	—	

Legende: s. S. 39

Tabelle 5: Einwirkung von Ca^{++} auf die Mg^{++} -ATPase und die $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase

Präparation	Enzym	Ca^{++} (Mol/L)	Spez. Akt.	% Hemmung
I	Mg^{++} -ATPase	0	24,979	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase	0	33,306	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase	0	8,327	
	Mg^{++} -ATPase	5×10^{-3}	22,727	9,2
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase	5×10^{-3}	22,932	31,2
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase	5×10^{-3}	0,205	97,5
II	Mg^{++} -ATPase	0	34,894	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase	0	58,072	
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase	0	23,718	
	Mg^{++} -ATPase	5×10^{-3}	32,011	8,5
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase	5×10^{-3}	36,193	40,4
	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase	5×10^{-3}	4,179	82,5

Inkubationsansätze: wie in Tabelle 4 angegeben. Dazu CaCl_2 in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen. Die Werte sind Mittelwerte $\bar{x}$ aus zwei Doppelbestimmungen von je einer Präparation. Spez. Akt.: $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$
 Pi nach Chen.

Aus den Tabellen 4 und 5 geht hervor, daß für die Na^+ - K^+ -ATPase Mg^{++} durch Ca^{++} nicht ersetzt werden kann. In Konzentrationen von 5×10^{-3} Mol/L CaCl_2 wird die Mg^{++} -ATPase um ca. 10 % gehemmt. Dagegen wird die Na^+ - K^+ -aktivierbare Mg^{++} -ATPase bei Anwesenheit von 5×10^{-3} Mol/L CaCl_2 nahezu vollständig gehemmt.

4.6. Einfluß von Ammoniak und Harnstoff auf die Na^+ - K^+ - Mg^{++} -ATPase.

Eine Permeation von Ammoniak wurde für Pansenschleimhaut sowohl als Efflux (Panseninhalt — Blut, Engelhardt³⁵, Orth und Kaufmann⁶⁸, Thorbek⁷¹, Hörnicke², Dobson¹, Mc Donald³⁹), als auch als Influx (Blut — Panseninhalt, Hörnicke², Engelhardt^{75,76}, Kurelec⁷⁷) beschrieben. Der Ammoniakgehalt im Pansen ist einerseits abhängig vom bakteriellen Abbau des Eiweißes (Orth und Kaufmann⁶⁸, Thorbek⁷¹), andererseits entsteht Ammoniak durch die Aktivität von Urease aus Harnstoff. Harnstoff kann sowohl durch das Futter als auch über den Speichel in die Vormagenabteilungen gelangen (Orth und Kaufmann⁶⁸, Thorbek⁷¹, Whanger⁷⁸). Außerdem wird von der Blutseite her eine Permeation von Harnstoff durch die Pansenschleimhaut beschrieben (Thorbek⁷¹, Hörnicke², Engelhardt^{75,76}, Kurelec⁷⁷). Für ATPasen verschiedener Herkunft (Skou⁶, Auditore⁶⁰) ist bekannt, daß bei der Aktivierung der Na^+ - K^+ - Mg^{++} -ATPase K^+ durch NH_4^+ ersetzbar ist. Für die artspezifischen Verhältnisse am Pansen war es von Interesse zu prüfen, ob unter optimalen Bedingungen für die Enzymaktivität der Na^+ - K^+ - Mg^{++} -ATPase NH_4 -Ionen bzw. Harnstoff Einfluß auf die spezifische Aktivität der Transport-ATPase haben.

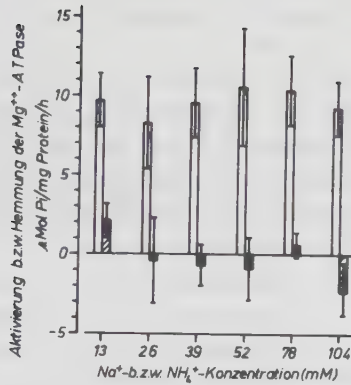


Abb. 14: Aktivierung der Mg⁺⁺-ATPase durch Na⁺- bzw.

NH₄⁺ und K⁺. Inkubationsansätze: 1,3 ml enthalten 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 3 mM ATP. Mg⁺⁺-ATPase: 7,5 mM MgCl₂, Na⁺-K⁺-Mg⁺⁺-ATPase: 7,5 mM MgCl₂, 24 mM KCl, NaCl wie oben angegeben (weiße Säulen). NH₄⁺-K⁺-Mg⁺⁺-ATPase: 7,5 mM MgCl₂, 24 mM KCl, NH₄Cl wie oben angegeben (schraffierte Säulen). Ordinate: Spez. Akt. in μ Mol Pi/mg Protein/h der Na⁺-K⁺-ATPase (Na⁺-K⁺-Mg⁺⁺-ATPase - Mg⁺⁺-ATPase) bzw. der NH₄⁺-K⁺-ATPase (NH₄⁺-K⁺-Mg⁺⁺-ATPase - Mg⁺⁺-ATPase). Abszisse: Endkonzentrationen von NaCl bzw. NH₄Cl. Werte: Mittelwert $\pm$ 1s von 4 Doppelbestimmungen aus 2 Präparationen. Alter der Membranen: 3 - 9 Tage. Pi nach Chen.

Zunächst wurde untersucht, ob bei Anwesenheit von Kalium NH_4^+ -Ionen die Mg^{++} -ATPase aktivieren können, d.h., ob Na^+ durch NH_4^+ ersetzbar ist. Die Abbildung 14 zeigt, daß für alle geprüften Konzentrationen Na-Ionen die ATP-Hydrolyse bei Anwesenheit von K^+ und Mg^{++} steigern. Austausch von Na^+ in den entsprechenden Inkubationsansätzen durch NH_4^+ bewirkt lediglich bei niedrigen Konzentrationen eine Aktivierung der Mg^{++} -ATPase um ca. 20 %. Steigende Konzentrationen von NH_4^+ bewirken im wesentlichen eine zunehmende Hemmung der Mg^{++} -ATPase. Signifikanz wurde errechnet zwischen 104 mM NH_4^+ und 13 mM NH_4^+ : $P < 0,005$ und zwischen 104 mM NH_4^+ und 78 mM NH_4^+ : $P < 0,1$.

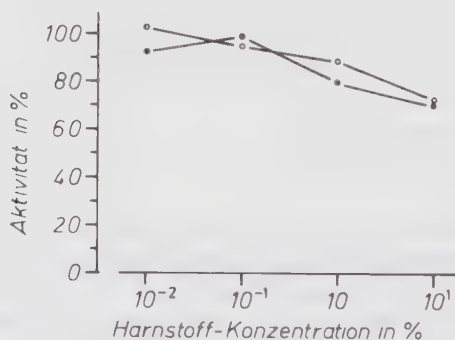


Abb. 15: Hemmung der ATPasen durch Harnstoff

Mg^{++} -ATPase = o — o,

$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Mg}^{++}$ -ATPase = . — .

Ordinate: Aktivität in Prozent der spezifischen Aktivität ohne Harnstoffzusatz. Abszisse: Endkonzentrationen von Harnstoff im Inkubationsansatz in Prozent. 7,5 mM MgCl_2 , 24 mM KCl , 104 mM NaCl . Die Werte sind Mittelwerte $\bar{x}$ von zwei Doppelbestimmungen aus einer Präparation. Pi nach Chen.

Der Einfluß von Harnstoff auf die Mg^{++} - und $Na^{+}-K^{+}$ - Mg^{++} -ATPase ist in Abbildung 15 (S. 44) dargestellt. Endkonzentrationen von 10^{-5} % bis 10^{-3} % hatten unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die spezifische Enzymaktivität. Endkonzentrationen größer als 10^{-2} % bewirkten eine zunehmende Hemmung beider ATPasen.

Neuere Untersuchungen von H. Newey et al.⁷⁹ haben gezeigt, daß in der Intestinalschleimhaut der Ratte die Resorption von L-Methionin von der intrazellulären Na^{+} -Konzentration abhängig ist. Die Autoren vermuten in diesem Zusammenhang einen Transportmechanismus für L-Methionin, der von der $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase abhängig ist. Zusatz von L-Methionin in Endkonzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-2} Mol/L hatten unter optimalen Versuchsbedingungen weder hemmende noch steigernde Wirkung auf die Mg^{++} - bzw. $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase.

4.7. Hemmung der $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase durch Ouabain

Aus der Literatur ist bekannt, daß die $Na^{+}-K^{+}$ -aktivierbare Mg^{++} -ATPase durch Ouabain hemmbar ist (Schatzmann¹⁶, Repke^{80,81}, Bonting⁸², Dunham⁶², Skou⁶, Yoda⁸³, Lindemayer⁵⁷). Die halbmaximale Hemmung durch Ouabain weist erhebliche Speziesunterschiede auf und ist abhängig von der Herkunft der Membranpräparation (Repke^{80,81}, Bonting⁵¹, Dransfeld und Greef⁶¹, Akerä et al.⁸⁴). Zur weiteren Charakterisierung der $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase in der vorliegenden Membranpräparation aus Epithelzellen des Pansens wurde für den Bereich der beiden gefundenen Maxima (I und II, Abbildung 12 S. 35) die Hemmbarkeit der $Na^{+}-K^{+}$ -Aktivierung mit Ouabain bestimmt. (Abb. 16) Für beide Meßreihen ergibt sich eine halbmaximale Hemmung bei ca. $2,5 \times 10^{-6}$ Mol/L. Zwischen den vergleichbaren Meßpunkten wurde Signifikanz bestimmt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Berechnung der Signifikanz für die in Abbildung 16 angegebenen Meßwerte

Ouabainkonzentration	P-Werte
10^{-7} Mol/l.	$\leq 0,15$
10^{-6} "	$\leq 0,30$
10^{-5} "	$\leq 0,25$
10^{-4} "	$\leq 0,20$

Aus der Tabelle geht hervor, daß sich bezüglich der Ouabainhemmung zwischen beiden Maxima der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase kein signifikanter Unterschied ergibt.

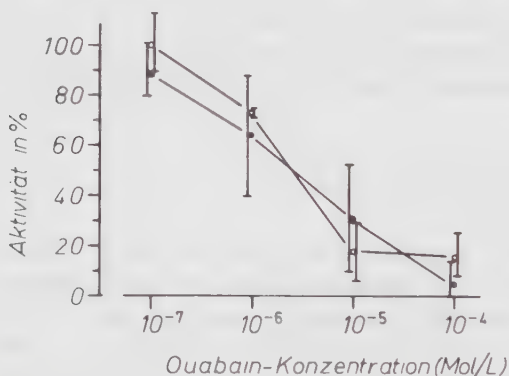


Abb. 16: Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase I (64/64) = o — o,

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase II (104/24) = . — .

Die Inkubationsansätze enthielten 7,5 mM MgCl_2 , 64 mM NaCl und 64 mM KCl bzw. 104 mM NaCl und 24 mM KCl. Ordinate: Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in Prozent der spezifischen Aktivität ohne Ouabain. Abszisse: Endkonzentration von Ouabain in Mol/L, Alter der Membranen: 14 Tage. Pi nach Chen. Die Werte repräsentieren Mittelwert $\bar{x} \pm 1s$ von 3 Doppelbestimmungen aus zwei Präparationen.

4.8. ATPase-Hemmung durch SH-Reagentien

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von ATPasen verschiedener Herkunft von freien SH-Gruppen wurde von mehreren Autoren ausführlich diskutiert (Skou⁶, ⁸⁵, Jean und Bader⁸⁶, Smith⁶⁴, Davis⁸⁷). In einer neueren Untersuchung von Gröschel - Stewart⁸⁸ konnte an Erythrozytenmembranen (Mensch) mit Hilfe von N-Äthyl-Maleinimid wahrscheinlich gemacht werden, daß zwei ATPasen mit unterschiedlicher Reaktivität der SH-Gruppen gegenüber N-Äthyl-Maleinimid vorkommen. Im nachfolgenden wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe verschiedener SH-Reagentien zu prüfen, ob in der vorliegenden Membranpräparation zwei verschiedene ATPasen vorkommen. Für diese Versuche wurden Inkubationsbedingungen gewählt, die zu Abbildung 12 (S. 35) beschrieben sind. Dabei ergaben sich für verschiedene Na^+ - K^+ -Konzentrationen zwei Optima (I und II) der spezifischen Aktivität. Es sollte geprüft werden, ob SH-blockierende Reagentien eine unterschiedliche Hemmung der Na^+ - K^+ -ATPase dieser beiden Maxima bewirken.

Aus Tabelle 7 (S. 48) geht hervor, daß von den geprüften Reagentien unter den gegebenen Versuchsbedingungen p-Chlormercuribenzoat die Na^+ - K^+ -ATPase auf beiden Maxima vollständig hemmt. Für Jodacetamid und Etacrynsäure wurden gegenüber Kontrollversuchen für die beiden geprüften Na^+ - und K^+ -Konzentrationen (Max. I und II) keine signifikanten Unterschiede gemessen. N-Äthyl-Maleinimid zeigte hingegen bei beiden Maxima eine meßbare unterschiedliche Hemmwirkung, die jedoch mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 bis 15 % behaftet ist.

Tabelle 7: Wirkung verschiedener SH-Gruppen blockierender Reagentien auf Mg^{++} - und $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Mg}^{++}$ -ATPase

Hemmstoff	Maximum I bzw. II $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Mg}^{++}$ -ATPase	$\frac{\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Mg}^{++} \text{-ATPase}}{\text{Mg}^{++} \text{-ATPase}}$	P	% Hemmung von $\bar{x}$
Kontrolle	I II	1,44 $\pm$ 0,30 1,47 $\pm$ 0,30		
p-Chlormerku- ribenzot (10^{-4} Mol/L)	I II	0,84 $\pm$ 0,17 0,99 $\pm$ 0,10	$< 0,45$	41,65 32,65
Jodacetamid (5×10^{-4} Mol/L)	I II	1,35 $\pm$ 0,24 1,36 $\pm$ 0,24	$< 0,10$	6,26 7,48
N-Äthyl-Malein- imid (5×10^{-4} Mol/L)	I II	1,25 $\pm$ 0,24 1,45 $\pm$ 0,45		13,20 1,36
Etacrynsäure (5×10^{-4} Mol/L)	I II	1,29 $\pm$ 0,33 1,34 $\pm$ 0,28		10,42 8,84

Zu Tabelle 7: (S. 48) Wirkung verschiedener SH-Gruppen blockierender Reagentien auf Mg^{++} - und $Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}$ -ATPase

Inkubationsansätze: 1,3 ml enthielten 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 3 mM ATP, 7,5 mM $MgCl_2$, 64 mM KCl und 64 mM NaCl (Max. I) bzw. 24 mM KCl und 104 mM NaCl (Max. II). Die SH-Reagentien wurden eingesetzt in Endkonzentrationen von: p-Chlormercuribenzoat 10^{-4} Mol/L, Jodacetamid, N-Äthylmaleinimid und Etacrynsäure 5×10^{-4} Mol/L. Inkubationszeit: 20 Minuten bei $37^{\circ}C$. Alter der Membranen: 5 Tage ($-20^{\circ}C$). P_i wurde nach Chen bestimmt. Die Meßwerte wurden als Quotient $\frac{Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}-ATPase}{Mg^{++}-ATPase}$ angegeben.

5. Diskussion

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß mit Hilfe des angewendeten Verfahrens Plasmamembranen aus Epithelzellen des Pansens mit hohen spezifischen Aktivitäten für bekannte Membranleitenzyme darstellbar sind. Dabei wurden Membranausbeuten erzielt, die in der Größenordnung von 4 mg Protein pro 100 g Naugewicht des Epithelgeschabsels lagen. In Tabelle 8 (S.51) sind die gefundenen spezifischen Aktivitäten der ATPasen (E.C. 3.6.1.3.) mit einigen aus der Literatur bekannten ATPasen, die an gereinigten Plasmamembranfraktionen gemessen wurden, vergleichend aufgeführt.

Ein Vergleich zeigt, daß die spezifische Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++}$ -ATPase im Gehirn mit Ausnahme der von Tanaka⁸⁹ gefundenen Werte deutlich über den an Plasmamembranen des Pansenepithels gemessenen liegt. Die spezifischen Enzymaktivitäten aus Leber- und Nieren-Membranfraktionen liegen teils höher, teils jedoch etwa gleich hoch. Alle anderen aufgeführten spezifischen Aktivitäten liegen unter den vorliegenden Messungen. Gegenüber früheren Befunden (Schnorr et al.⁴⁰) konnte mit dem angewandten Trennverfahren sowohl die Ausbeute, als auch die spezifische Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++}$ -ATPase ca. um einen Faktor 10 verbessert werden. Der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -aktivierbare Anteil der Mg^{++} -ATPase ist von der Behandlung (Skou⁶) der Membranen abhängig. Vergleichende Betrachtungen sind aus diesem Grunde für die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase unsicher.

Einleitend wurde in der Arbeit darauf hingewiesen, daß nach der vorliegenden Literatur zwischen primären, sekundären und tertiären aktiven Transport und der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase ein direkter Zusammenhang als gesichert angesehen werden kann. Die gefundenen spezifischen Aktivitäten können somit ein Hinweis sein, daß im Pansenepithel die biochemischen Voraussetzungen für einen aktiven Transport gegeben sind.

Tabelle 8: Vergleich der spezifischen Aktivitäten einiger ATPasen aus verschiedenen Geweben

Tierart und Gewebe	Mg ⁺⁺ -ATPase Mol Pi/mg	Na ⁺ -K ⁺ -Mg ⁺⁺ -ATPase Protein/h	Autoren
<u>Mensch</u> Thrombozyten	1,28	1,66	Moake et al. ⁹¹
<u>Ratte</u> Niere	93,60	108,00	Kinne " ⁹⁴
Leber	39,30	—	Coleman ⁴²
"	40,10 ± 5,8	51,70 ± 7,4	Emmelot ⁴³
"	46,40 ± 7,8	57,10	" ⁹²
Herzmuskel	1,96	2,60	Dransfeld ⁹³
Skelettmuskel	1,79	2,71	" ⁹³
<u>Maus</u> Leber	32,40 ± 3,7	49,80	Emmelot ⁹²
<u>Schwein</u> Leber	119,67	122,98	Lutz ⁹⁵
<u>Hund</u> Herzmuskel	3,66 ± 0,12	9,48 ± 0,42	Stam ²²
<u>Kaninchen</u> Herzmuskel	0,55 ± 0,06	0,95 ± 0,06	Dransfeld ⁶¹
"	1,68	2,57	" ⁹³
Skelettmuskel	3,10 ± 0,10	3,63 ± 0,07	" ⁶¹
"	1,55	1,92	" ⁹³
<u>Meerschweinchen</u> Herzmuskel	0,87 ± 0,08	2,83 ± 0,17	" ⁹⁶
"	0,77	1,76	" ⁹³
Skelettmuskel	3,01	3,87	" ⁹³
Niere	16,40 ± 0,10	47,60 ± 2,00	Davis ⁸⁷
<u>Rind</u> Gehirn	—	450 - 750	Yoda ⁸³
Gehirn	29,80	139,40	Skou ⁸⁵
"	—	2,49	Tanaka ⁸⁹
Corneaepithel	1,28	1,66	Allin ⁶⁵
Pansenepithel	5,94	8,07	Schnorr ⁴⁰
"	24,97 ± 9,57	35,04 ± 13,76	s. Tabl.3
(eigene Werte)			S. 38

Auffallend ist, daß in der vorliegenden Membranpräparation alkalische Phosphatase nicht nachweisbar ist. Dies ist in Übereinstimmung mit den histochemischen Untersuchungen von Schnorr⁹⁰ ein Hinweis dafür, daß bei dem vorliegenden Verfahren im wesentlichen Plasmamembranen aus den basalen Zellschichten isoliert wurden. Histochemisch ist die alkalische Phosphatase im Stratum basale und Stratum spinosum profundum nicht und im Stratum spinosum superficiale (Intermediärzellen) nur sehr schwach nachweisbar. Die spezifische Aktivität der 5'-Nucleotidase läßt sich mit den in Leberzellmembranen der Ratte von Emmelot et al.⁹² ($32,2 \pm 6,8$ E, $51,0 \pm 6,7$ E) und Coleman⁴² ($31,3$ E, $91,3$ E) gefundenen Aktivitäten größenordnungsmäßig vergleichen.

Die Verunreinigung mit Mitochondrien gemessen an der spezifischen Aktivität der Succinatdehydrogenase in der Fraktion d = 1,16 liegt ca. 1,3 mal höher als die in der Leber von Coleman⁴² gefundene. Die Kontamination mit Lysosomen, bezogen auf die spezifische Aktivität der sauren Phosphatase und der β -Glucuronidase, ist im Vergleich zu Emmelot⁹² bzw. Coleman⁴² ca. 15 mal größer.

Aus den elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahmen (Abb. 1 S. 20 und Abb. 2 S. 21) geht hervor, daß Mitochondrien und Lysosomen nur vereinzelt und Mikrosomen nicht mit Sicherheit identifizierbar sind.

Der in Tabelle 1 (S. 18) angegebene Anreicherungsfaktor für Leitenzyme von Plasmamembranen von durchschnittlich 2, bezogen auf das Ausgangshomogenat, stellt sich insofern ungünstig dar, als im Ausgangshomogenat bereits weitgehend bindegewebsfreie und nach Ultraschallbehandlung bereits aufgeschlossene Zellen vorliegen. Dieser Bezugswert wurde gewählt, da eine exakte Protein- und Enzymbestimmung in dem Epithelgeschässel (Ausgangsmaterial) nicht möglich war.

*E = μ Mol freigesetztes Substrat/mg Protein/h.

Aus der zur Verfügung stehenden Literatur sind systematische Alterungsversuche mit Enzympräparationen von ATPasen nur von Auditore et al.⁶⁰, Hegner⁹⁷ und Jørgensen et al.⁹⁸ bekannt. Das Altern bzw. das Einfrieren von Enzympräparationen wird in der Literatur (Skou⁶) als Methode angegeben, den Quotient
$$\frac{\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}}{\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}}$$
 zu erhöhen.

Der gemessene Quotient in Versuchsreihe II (Abb. 8, S. 28) steigt bis zum 11. Tag an, um dann wieder abzunehmen. Diese Messungen sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Auditore⁶⁰ an Herzmuskelmikrosomen. Auffallend ist, daß Aufbewahrung bei +2° - +4°C bereits innerhalb von 24 Stunden zu einem Aktivitätsverlust von 40 % führt. Dieser Befund stimmt mit den von Hegner⁹⁷ gemessenen Werten überein. Aufbewahrung bei 0°C führt nach Auditore et al.⁶⁰ nur zu einer Aktivitätsminderung von ca. 10 bis 20 % innerhalb von 24 Stunden. Jørgensen et al.⁹⁸ fanden für eine stark angereicherte Na⁺-K⁺-ATPase bei Aufbewahrung bei 0°C einen Aktivitätsverlust von ca. 10 % erst nach 60 Tagen.

Die vorliegenden Alterungsversuche für ATPasen an isolierten Epithelzellmembranen weisen darauf hin, daß bei der Beurteilung von Transportversuchen mit der isolierten Pansenschleimhaut (von Engelhardt³⁸) ein rascher Aktivitätsverlust der ATPasen insbesondere bei höheren Temperaturen berücksichtigt werden sollte.

Die in Tabelle 8 (S. 51) angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden an Plasmamembranen gemessen, die bei -20°C gelagert waren. An frisch isolierten Membranen dürften die spezifischen Aktivitäten unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Abbildungen 4 bis 7 höher sein. Da bei Aufbewahrung bei -20°C nach ca. 3 Wochen noch eine spezifische Aktivität von etwa 70 % vorhanden ist, ist damit die Möglichkeit gegeben, weitere Anreicherungsversuche vorzunehmen.

Abbildung 9 (S. 31) zeigt, daß eine maximale Aktivierung der Mg^{++} -ATPase bei einem Verhältnis von 2,5 : 1 der Mg^{++} -Konzentration : ATP-Konzentration stattfindet. Das entspricht in etwa den von Dunham und Glynn⁶² (Erythrozytenmembran) sowie Skou^{6,11} (peripherer Nerv) in Gegenwart von Na- und K-Ionen als optimal angegebenen Mg^{++} : ATP-Verhältnis von 2 : 1. Auditore⁶⁰ (Herzmuskelmikrosomen), Smith⁶⁴ (Erythrozytenmembran), Allin⁶⁵ (Corneaeptithel) sowie van Os⁶⁶ (Gallenblasenepithel) fanden dagegen eine maximale Aktivierung bei einem Mg^{++} : ATP-Verhältnis von 1 : 1, wenn nur Mg-Ionen im Inkubationsmedium vorhanden waren.

Ein transepithelialer aktiver Transport von Ca^{++} ist für das Pansenepithel nach der vorliegenden Literatur nicht beschrieben. Für subzelluläre Partikel ist inzwischen erwiesen, daß der Ca^{++} -Transport an einen ATP-abhängigen Carriermechanismus gekoppelt, aber unabhängig vom Na^{+} - K^{+} - Mg^{++} -aktivierbaren Transportsystem ist (Ohtsuki²⁷). Die vorliegenden Untersuchungen an Epithelzellmembranen sprechen für das Vorkommen einer hohen spezifischen Aktivität von Ca^{++} -aktivierbarer ATPase (Abb. 10, S. 32). Dieser Nachweis gewinnt für das Pansenepithel insofern besonderes Interesse, als einerseits neuere Befunde vorliegen, daß im Intestinalepithel ein Ca^{++} -abhängiger Transport von Fettsäuren (Munday et al.²⁹) und Aminosäuren (L-Leucin, Reiser et al.³⁰) vorkommt. Andererseits wurde für das Pansenepithel ein aktiver Transport von Fettsäuren (Stevens et al.^{36,37}) und Aminosäuren (Hörnigke²) vermutet. Damit wäre für das Pansenepithel die biochemische Voraussetzung für einen Ca^{++} -abhängigen aktiven Carriermechanismus gegeben.

Aus dem Diagramm Abbildung 11 (S. 33) ist zu entnehmen, daß die Geschwindigkeitskonstante für die ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von Mg^{++} in einem Bereich von 10^{-6} bis

10^{-3} Mol/L um einen Faktor 3 größer ist als bei Anwesenheit von Ca^{++} . Die Affinitätskonstante für das ATP-hydrolysierende System zeigt für Mg^{++} und Ca^{++} meßbare Unterschiede. Sie beträgt für Mg^{++} $1,05 \times 10^{-3}$ Mol/L und für Ca^{++} $1,6 \times 10^{-3}$ Mol/L. Die von einigen Autoren (Borle²³, Manery²⁶, Ohtsuki²⁷) diskutierte Frage, ob es sich bei der Ca^{++} - und der Mg^{++} -ATPase um das gleiche Enzymsystem handelt, muß dabei zunächst offen bleiben, da der Versuch einer präparativen Trennung der beiden Enzyme, vergleichbar mit den Ergebnissen von Ohtsuki²⁷, bisher nicht durchgeführt wurde. Ein Hinweis, daß es sich bei der vorliegenden Präparation um getrennte Systeme handelt, ergibt sich, neben den unterschiedlichen Affinitätskonstanten, aus den Befunden der Tabellen 4 und 5 (S. 40 und 41), die zeigen, daß die Ca^{++} -abhängige ATPase durch Na^+ und K^+ nicht weiter aktivierbar ist.

Die Ergebnisse in Abbildung 12 (S. 35) über das Aktivierungsmaximum der Mg^{++} -aktivierbaren ATPase in Abhängigkeit von der Na^+ - und K^+ -Konzentration zeigt zwei signifikant zu unterscheidende Gipfel. Das Verhältnis $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ der beiden Maxima beträgt ca. 5 : 1 bzw. 1 : 1. Ähnliche, jedoch nicht näher diskutierte Befunde wurden von Dransfeld und Greif⁶¹ an Skelettmuskelmembranen des Kaninchens erhoben. Die Aktivierungsmaxima der aus der vorliegenden Literatur bekannten ATPasen verschiedener Herkunft liegen bei einem $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ -Verhältnis von ca. 10 : 1. Eine Ausnahme bildet die von Skou¹¹ an Krebsnerven gemessene ATPase, bei der ein optimales $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ -Verhältnis von 1 : 1 vorlag. Für die Deutung dieser beiden Maxima in Pansenepithelzellmembranen könnten folgende Hypothesen diskutiert werden:

1. Es liegen zwei verschiedene Enzymsysteme vor.

a) Eine der beiden $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasen ist die Voraus-

setzung für den Aufbau einer lokalen osmotischen Pufferzone zwischen Epithelzellen des Pansens, die von Engelhardt³⁸ ausführlich diskutiert wurde. Die zweite ATPase ist Bestandteil von Membranen der gleichen Zellschicht und ist in Regionen lokalisiert, die an dem Aufbau der obengenannten Pufferzone nicht teilhaben.

- b) Die beiden ATPasen stammen aus Membranen verschiedener Zellschichten, zum Beispiel Stratum basale und Stratum spinosum profundum.
2. Es handelt sich nur um einen "Mechano-Enzymkomplex", der die ATP-Hydrolyse bei einem $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ -Verhältnis sowohl von ca. 5 : 1 als auch 1 : 1 maximal katalysiert.

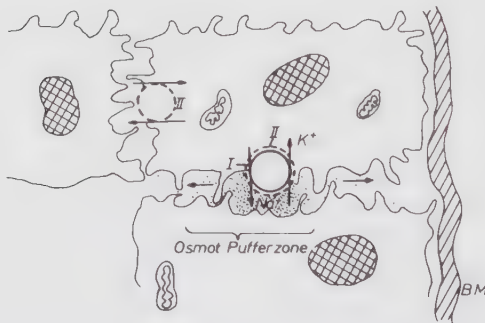


Abb. 17: Modell zur Lokalisation der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in Anlehnung an Diamond und Tormey⁹⁹ sowie Hyden und Sperber (nach Engelhardt³⁸).

ATPase I: durchgezogener Kreis ($\text{Na}^+ : \text{K}^+ = 1 : 1$)
ATPase II: unterbrochener Kreis ($\text{Na}^+ : \text{K}^+ = 5 : 1$)

Erläuterungen siehe Text.

Eine zusammenfassende schematische Darstellung zur Lokalisation der Transport-ATPasen in den Basalzellen, die einerseits die von Diamond und Tormey⁹⁹ und andererseits die von Engelhardt³⁸ für Epithelzellager diskutierten Hypothesen berücksichtigt, zeigt Abbildung 17 (S. 56).

Nach diesem Modell würde Na^+ aktiv im Interzellulärspalt konzentriert. Der lokal entstehende osmotische Druck wäre die treibende Kraft für einen Flüssigkeitstransport sowohl in Richtung Basalmembran als auch Pansenlumen (Engelhardt³⁸).

Ein Vergleich des pH-Optimums der gemessenen ATPasen (Abb. 13, S. 37) mit einigen aus der Literatur bekannten Messungen ist in Tabelle 9 (S. 58) zusammengefaßt.

In dem für das Pansenmilieu bekannten physiologischen pH-Bereich von 5,8 bis 7,3 (Koch-Grub⁶⁷, Dobson¹, Orth und Kaufmann⁶⁸) schwankt die Aktivität von ca. 45 % bis ca. 80 % der maximalen Aktivität. Auffallend im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten pH-Optima ist, daß für Pansenepithelzellen die vom pH abhängige spezifische Aktivität kein engbegrenztes scharfes Optimum aufweist.

In den Versuchen der Abbildung 14 (S.43) sollte gezeigt werden; daß Na^+ durch NH_4^+ nicht ersetzbar ist. Aus dem Diagramm geht hervor, daß Austausch von Na^+ gegen NH_4^+ in steigenden Konzentrationen Transport-ATPasen hemmt. Dieser Befund gewinnt insofern Interesse, als hohe NH_3 -Konzentrationen im Pansen den aktiven Transport monovalenter Ionen stören (Hörnicker²). Außerdem ist bekannt, daß der Gehalt an NH_4^+ einen gekoppelten Transport von Aminosäuren insofern beeinflusst, als NH_4^+ anstelle der zu transportierenden Aminosäuren anionische Bindungsstellen eines bisher nicht näher definierten Carriers besetzen kann (Ring¹⁴).

Tabelle 9: Vergleich der pH-Optima verschiedener ATPasen

Gewebe	Enzym (ATPase)	optimaler pH-Wert	Autor
Säugetier- gewebe	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} -$ ATPase	7,5 - 7,6	Skou ²⁹
Nerven (Krebs)	"	7,2	" 29
Thrombo- zyten (Msch.)	"	7,3 - 7,4	Moake ²⁸
<u>Gehirn</u>			
Rind	"	7,4	Tanaka ²⁷
Kaninchen	"	7,4	" 27
Katze	"	6,6	" 27
Meerschwein	"	6,6	" 27
Ratte	"	7,0	" 27
Gallenblase (Kaninchen)	"	7,5	van Os ³⁷
"	$\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$	9,0	" 37
Erythrozyt (Mensch)	$\text{Mg}^{++} - \text{K}^+ -$ ATPase	7,8	Smith ²⁶
Pansenepi- thelzellen (Rind)	$\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} -$ ATPase	7,0 7,0	eigene Befunde (s. Abb. 13 S.37) "

Mit Hilfe der Hemmung durch SH-Reagentien (Tabelle 7, S. 48) und Ouabain (Abb. 16 S. 46) sollte geprüft werden, ob die beiden gefundenen Aktivierungsmaxima der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase auf diesem Weg als zwei verschiedene ATPasen identifiziert werden können. Neuere Untersuchungen (Allin⁶⁵) am Corneaepithel des Rindes haben ergeben, daß eine Ouabain unempfindliche $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in Epithelzellen vorkommen kann.

In der vorliegenden Präparation konnte lediglich durch Hemmversuche mit N-Äthyl-Maleinimid wahrscheinlich gemacht werden, daß es sich um zwei verschiedene $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasen handelt. Alle übrigen geprüften Hemmstoffe ergaben keine sicheren Anhaltspunkte für diese Hypothese.

Späteren Untersuchungen über weitere Subfraktionierung und Anreicherung dieses Transportenzyms muß die nähere Identifizierung dieser beiden Aktivierungsmaxima vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung:

Es wurde ein Verfahren entwickelt, Plasmamembranen aus basalen Epithelzellen des Pansens zu isolieren. Die Ausbeute betrug ca. 4 mg Protein pro 100 g Naßgewicht des Epithelgeschabsels. Die spezifische Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ ist mit $35,04 \pm 13,76$ $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ vergleichbar denen, an Plasmamembranen parenchymatöser Organe gemessenen. Die spezifischen Aktivitäten einiger Leitenzyme für Plasmamembranen wurden bestimmt.

Für die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++} -$ und die $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ wurden Eigenschaften wie Ionenabhängigkeit, pH-Abhängigkeit sowie Beeinflussung durch Herzglykoside und einige für die Pansenphysiologie bedeutsame niedermolekulare Substanzen geprüft.

Es wurden zwei $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasen}$ wahrscheinlich gemacht, mit Aktivierungsmaxima bei einem $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ -Verhältnis von ca. 5 : 1 bzw. 1 : 1, die sich in Bezug auf ihre Hemmbarkeit mit SH-Reagentien (insbesondere N-Äthylmaleinimid) unterschiedlich verhalten.

Darüber hinaus wurde eine Ca^{++} -aktivierbare ATPase hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von der Ca^{++} -Konzentration näher beschrieben.

Die Befunde werden im Zusammenhang mit aus der Literatur bekannten Transportphänomenen des Pansens diskutiert.

Literatur

1. DOBSON, A.: Physiological peculiarities of the ruminant relevant to drug distribution.
Fed.Proceed. 26, 994 - 1000, (1967)
2. HÖRNICKE, H.: Physiologie des Pansens, in "Zeitschr. für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde", 19, 92 - 117, (1964)
edt.von H. Brune
3. KEYNES, R.D.: From frog skin to sheep rumen: a survey of transport of salts and water across multicellular structures.
Quart.Rev.Biophys. 2, 177 - 281, (1969)
4. STEIN, W.D.: The movement of molecules across cell membranes.
Academic Press, New York and London, (1967)
5. BITTAR, E.E.: Membranes and ion transport, Vol.1,
Wiley Interscience; London, New York,
Sydney, Toronto, (1970)
6. SKOU, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane.
Physiol.Rev. 45, 596 - 617, (1965)
7. COLLANDER, R.: The permeability of plant protoplasts to small molecules.
Physiol.Pantarum 2, 300 - 311, (1949)
8. HODGKIN, A.L., and KEYNES, R.D.: The potassium permeability of a giant nerve fibre.
J.Physiol. 128, 61 - 88, (1955)

9. PASSOW, H.: Ion and water permeability of the red blood cell. In "The Red Blood Cell", (edt. by C. Bishop and D.M. Surgener) Chapter 3. Adademic Press, New York (1964)
10. WILLBRANDT, W. and ROSENBERG, T.: The concept of carrier transport and its corollaries in pharmacology.
Pharmac.Rev. 13, 109 - 184, (1961)
11. SKOU, J.C.: The influence of some cations on an adenosin triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim.Biophys.Acta 23, 394 - 401, (1957)
12. DUNCAN, C.J.: Properties and stabilization of the lysosomal membrane.
Nature 210, 1229 - 1230, (1966)
13. ALBERS, R.W.: Biochemical aspects of active transport.
Ann.Rev.Biochem. 36, 727 - 756, (1967)
14. RING, K.: Einige Aspekte des aktiven Aminosäuretransportes.
Angew.Chemie 82. Jahrg. 1970, Nr.9, 343 - 355.
15. CRANE, R.K.: Na^+ -dependent transport in the intestine and other animal tissues.
Fed. Proceed. 24, 1000 - 1006, (1965)
16. SCHATZAMNN, H.J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran.
Helv.physiol.Acta II, 346, (1953)

17. WHITTAM, R., and AGER, M.E.: The connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes.
Biochem.J. 97, 214 - 227, (1965)
18. CHRISTENSEN, H.N.: Methods for disdinguishing amino Acid transport systems of agiven cell or tissue.
Fed.Proceed. 25, 850 - 853, (1966)
19. KOEFOED-JOHNSON, V., and USSING, H.H.: Nature of the frog skin potential.
Acta physiol.Scand. 42, 298 - 308, (1958)
20. DIAMOND, J.M.: Transport of salt and water in rabbit and guinea-pig gall bladder.
J.Gen.Physiol. 48, 1 - 14, (1964)
21. DIAMOND, J.M.: The mechanism of isotonic water transport.
J.Gen.physiol. 48, 15 - 42, (1964)
22. STAM, A.C., Jr., SHELBURNE, J.W., FELDMAN, D., SONNENBLICK, E.H.: A myocardial sarcolemma praeparation and the ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase.
Biochim.Biophys.Acta 189, 304 - 307, (1969)
23. BORLE, André B., M.D.: Membrane transfer of calcium.
Reprinted from clinical orthopaedics Nr.52.
Copyright, 1967, by J.B. Lippincott Company.
24. SCHATZMANN, H.J.: ATP-dependent Ca^{++} -extrusion from human red cells.
Seper.Experientia 22, 364, (1966)

25. SCHATZAMNN, H.J., and VINCENZI, F.F.: Calcium movements across the membrane of human red cells.
J.Physiol. 201, 369 - 395, (1969)
26. MANERY, J.F.: Calcium and membranes.
In "Mineral Metab. III, 405 - 452, (1969)
27. OHTSUKI, I.: ATP-dependent Ca^{++} -uptake of brian microsomes.
J.Biochem. Vol.66, Nr.5, 645 - 650, (1969)
28. CHANCE, B., and MELA, L.: A hydrogen ion concentration gradient in a mitochondrial membrane.
Nature, 212, 369 - 372, (1966)
29. MUNDAY, R.A., PARSONS, B.J., and YORK, D.A.: The effect of Ca -ions on long chain fatty acid transport by slices of rat jejunum.
J.Physiol. 211, 517 - 526, (1970)
30. REISER, S., and CHRISTIANSEN, P.A.: The properties of the preferential uptake of L-leucine by isolated intestinal epithelial cells.
Biochim.Biophys.Acta 225, 123 - 139, (1971)
31. SCOTT, D.: Absorption of chloride from the rumen of the sheep.
Res.vet.Sci. 11, 291 - 293, (1970)
32. SPERBER, J., and HYDEN, S.: Transport of chloride Through the ruminal mucosa.
Nature 169, 587, (1952)

33. DOBSON, H.: Active transport through the epithelium of the reticulorumen sac.
J.Physiol. 146, 235 - 251, (1959)
34. STEVENS, C.E.: Transport of sodium and chloride by the isolated rumen epithelium.
Americ.J.Physiol. 206, 1099 - 1105, (1964)
35. ENGELHARDT, W.v.: Der osmotische Druck im Panseninhalt.
Zbl.Vet.Med.A, 16, 665 - 690, (1969)
36. STEVENS, C.E., and STETTLER, B.K.: Transport of fatty acid mixtures across rumen epithelium.
Americ.J.Physiol. 211, R 264 - 271, (1966)
37. STEVENS, C.E., DOBSON, A., and MAMMANO, J.H.:
A transepithelial pump for weak electrolytes.
Americ.J.Physiol. 216, 983 - 987, (1969)
38. ENGELHARDT, W.v.: Der Wasserdurchtritt durch die Pansenschleimhaut.
Zbl.Vet.Med.A, 16, 597 - 625, (1969)
39. McDONALD, J.W.: The absorption of ammonia from the rumen of the sheep.
Biochem.J. 42, 584, (1948)
40. SCHNORR, B., HEGNER, D. und ECKERMANN, V.: Die Isolierung von Plasmamembranen vom Plattenepithel des Pansens.
Cytobiologie 1, 132, - 134, (1969)

41. SCHNORR, B.: Histochemische, elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen über die ATPasen im Vormagenepithel der Ziege. Z.Zellforsch. 114, 365 - 389, (1971)
42. COLEMAN, R., MITCHEL, R.H., FINEAN, J.B., HAWTHORNE, J.N.: A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions. Biochim.Biophys.Acta 135, 573 - 579, (1967)
43. EMMELOT, P., BOS, C.S., BENEDETTI, E.J., and RUNKE, Ph.: Studies of plasma membranes. Biochim.Biophys.Acta 90, 126 - 145, (1964)
44. MICHEL, R.H., and HAWTHORNE, J.N.: The site of di-phosphoinositide synthesis in rat liver. Biochem.Biophys.Res.Comm. 21, 333, (1965)
45. PLAUT, G.W.E.: In "Methods in Enzymology, VI, P.231, (1963)
46. GIANETTO, R., and DE DUVE, C.: Tissue fraction studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. Biochem.J. 59, 433, (1955)
47. HARPER, A.F.: In "Methoden der enzymatischen Analyse". (edt.H.U.Bergmeyer). Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße, p. 778, (1962)

48. PENNINGTON, R.S.: Mitochondrial succinat-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase.
Biochem.J. 80, 649, (1961)
49. FISHMAN, W.H., SPRINGER, B., and BRUNETTI, R.:
Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood β -glucuronidase.
J.biol.Chem. 173, 449, (1948)
50. FOLIN, O., and CIOCALTEU, V.: On tyrosine and tryptophane determination in proteins.
J.biol.Chem. 73, 627, (1927)
51. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.biol.Chem. 193, 265, (1951)
52. SCHRÖDER, M., HORN, A. und BÖHRING, H.: Eine schnelle Mikromethode zur Routinebestimmung von Orthophosphat.
Acta biol.med.germ. Bd. 22, 803 - 809, (1969)
53. BRUCE, N.A., and DUBIN, D.T.: The role of polyamines in the neutralisation of bacteriophage desoxyribonucleic acid.
J.biol.Chem. 235, 769, (1960)
54. SCHNORR, B. und VOLLMERHAUS, B.: Das Oberflächenrelief der Pansenschleimhaut bei Rind und Ziege.
Zbl.Vet.Med., A, 14, 93 - 104, (1967)
55. HECKMANN, K.: Zur Theorie der "Single File"-Diffusion,
I.Ztschr.Physik.Chem. NF 44, 184 - 203, (1965)
u.II.Ztschr.Physik.Chem.NF 46, 1 - 25, (1965)

56. EVANS, W.H.: Fraktionation of liver plasmamembranes prepared by zonal centrifugation.
Biochem.J. 166, 833 - 842, (1970)
57. LINDENMAYER, G.E., and SCHWARTZ, A.: Conformational changes induced in Na^+ - K^+ -ATPase by ouabain through a K^+ -sensitive reaktion: Kinetic and spectroscopic studies.
Arch.Biochem.Biophys. 140, 371 - 378, (1970)
58. SCHWARTZ, A.: A Na^+ + K^+ -stimulated adenosin triphosphatase in microsomal fractions from rat liver.
Biochim.Biophys.Acta 67, 329 - 331, (1964)
59. SCHWARTZ, A.: A sodium and potassium-stimulated adenosin triphosphatase from cardiac tissues.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 9, 301, (1962)
60. ANDITORE, J.V., and MURRAY, L.: Cardiac (microsomal) Na^+ + K^+ adenosin triphosphatase and its possible relationship to the active Na^+ + K^+ -transport system.
Arch.biochem.Biophys. 99, 373 - 382, (1962)
61. DRANSFELD, M. GREEF, K., BERGER, H. und CAUTIUS, V.: Die verschiedene Empfindlichkeit der Na^+ + K^+ -aktivierbaren ATPasen des Herz- und Skelettmuskels gegen K-Strophanthin.
Arch.Pharmak.exp.Path. 254, 225 - 234, (1966)
62. DUNHAM, E.T., and GLYNN, J.M.: Adenosintriphosphatase activity and the active movements of alkali ions.
J.Physiol. 156, 274 - 293, (1961)

63. MÓZSIK, G.: Some feed-back mechanism by drugs in the interrelationship between the active transport system and adenyl cyclase system localized in the cell membrane.
Europ.J.Pharmak. 7, 319 - 327, (1969)
64. SMITH, F.M., and VERPOORTE, J.A.: Mg^{++} -activated ATP-hydrolysis and sulfhydryl groups in membranes from human erythrocytes.
Canad.J.Biochem. 48, 604 - 612, (1970)
65. ALLEN, W.D., MILLER, J.R., and MATUK, Y.: Some properties of an ATPase obtained from beef corneal epithelium.
Canad.J.Physiol.and Pharmacol. 48, 176 - 181, (1970)
66. VAN OS, C.H., and SLEGGERS, J.F.G.: Characteristics of $Na^{+}-K^{+}$ -stimulated ATPase in rabbit gall bladder epithelium.
Pflügers Arch. 319, 49 - 56, (1970)
67. KOCH-GRUB, G.: In: Physiologie des Pansens, Zeitschr. für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 19, 24 - 43, (1964) ed. von H.Brune.
68. ORTH, A. und KAUFMANN, W.: Die Verdauung im Pansen und ihre Bedeutung für die Fütterung der Wiederkäuer.
1961, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
69. DIRKSEN, G.: Über die Pansenazidose des Rindes.
Vet.Med.Nachr. 2, 79 - 108, (1965)

70. DIRKSEN, G.: Acidosis. Proc. III International Symp. on Physiol. of Digestion and Metabolism in the Ruminant. Cambridge, England, Oriel Press, Newcastle upon Tyne.
71. THORBECK, G.: In: Physiologie des Pansens, Zeitschr. für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde, 19, 50 - 65, (1964)
72. AUSTIN, F.H.: Absorption, distribution and excretion of sulfonamides in ruminants. Fed.Proceed. 26, 1001 - 1005, (1967)
73. PHILLIPSON, A.T.: Comments on absorption in ruminants. Fed.Proceed. 26, 1006 - 1007, (1967)
74. SEMENZA, G., LANDUCCI, S., MÜLHAUPT, E.: Neue kationische Puffer. Helv.chim.Acta 45, 2306, (1962)
75. ENGELHARDT, W.v., HÖRNICKE, H., NIETZEL, W. und EHRLEIN, H.S.: Zur Messung von Austauschvorgängen durch die Pansen- und Labmagenwand mit Hilfe von Markersubstanzen und Radioisotopen. Zbl.Vet.Med. B 12, 669 - 675, (1965)
76. ENGELHARDT, W.v. und NICKEL, W.: Die Permeabilität der Pansenwand für Harnstoff, Antipyrin und Wasser. Pflügers Arch. 286, 57 - 75, (1965)
77. KURELEC, B., HARMEYER, J. und HILL, H.: Über Funktion der Arginase, Urease und Ornithintranscarbomylase der Pansenwand. Zbl.Vet.Med. A 15, 460 - 469, (1968)

78. WHANGER, P.D., and CHURCH, D.C.: Enzyme activities of ruminant digestive tract epithel tissue. J.Amerc.Science 30, 944, (1970)
79. NEWAY, H., RAMPONE, A.J., and SMYTH, D.H.: The relation between L-methionin uptake and sodium in rat small intestine in vitro. J.Physiol. 211, 539 - 549, (1970)
80. REPKE, K.: Biochemie und Klinik der Digitalis. Aus: Der Internist 7, 418, (1966)
81. REPKE, K.: Effect of digitalis on membrane adenosin triphosphatase of cardiac muscle. Proceed.Second Int.Pharmak.Med. 1965, S. 65, Pergamon Press.
82. BONTING, S.L., CARAVAGGIO, L.L., and HAWKINS, N.H.: Studies on sodium potassium-activated adenosintriphosphatase. Arch.Biochem,Biophys. 98, 413 - 419, (1962)
83. YODA, A., and HOKIN, L.E.: On the reversibility of binding of cardiotonic steroids to a partially purified ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-activated ATPase from beef brain. Biochem.Biophys.Res.Comm. 40, 880 - 886, (1970)
84. AKERA, T., LARSEN, F.S., and BRODY, T.M.: The effect of ouabain on sodium- and potassium-activated adenosin triphosphatase from the hearts of several mammalian species. J.Pharmak.exp.Therap. 170, 17 - 26, (1969)

85. SKOU, J.C.: Studies on the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -activated ATP-hydrolysing enzyme system.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 10, 79 - 84, (1963)
86. JEAN, D.H., and BADER, H.: Activation and inhibition of $(\text{Na}^+\text{-K}^+)\text{-ATPase}$ by N-ethylmaleinimid.
Biochim.Biophys.Acta 212, 198 - 200, (1970)
87. DAVIS, P.W.: Inhibition of renal $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -activated ATPase-activity by ethacrynic acid.
Biochem.Pharmak. 19, 1983 - 1989, (1970)
88. GRÖSCHEL-STEWART, U.: Demonstration of two ATPases in human erythrocyte membranes.
Sep.Experientia 25, 601 - 602, (1969)
89. TANAKA, R.: Comparison of lipid-effects on $\text{K}^+\text{-Mg}^{++}$ -activated p-nitrophenyl phosphatase and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Mg}^{++}$ -activated adenosin triphosphatase of membrane.
J.Neurochem. 16, 1301 - 1307, (1969)
90. SCHNORR, B.: Cytochemische Untersuchungen über die alkalische Phosphatase im Vormagenepithel der Ziege.
Z.Zellforsch. 114, 175 - 192, (1971)
91. MOAKE, J.L., AHMED, K., BACHURAND, N.R., GUTFREUND, D.E.: Mg^{++} -dependent, $(\text{Na}^+\text{-K}^+)\text{-stimulated ATPase}$ of human platelets.
Biochim.Biophys.Acta 211, 337 - 344, (1970)

92. EMMELOT, P., and BENEDETTI, E.L.: On the possible involvement of the plasma membrane in the carcinogenic process.
In: "R.W.Cumley: Carcinogenesis. A Broad Critique. 441 - 531, (1967), McMillan and Wilkinson Comp., Baltimore.
93. DRANSFELD, H., GALETZE, E. und GREEF, K.: Die Wirkung des Prednisolonbisguanylhydrazons auf die $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierte Membran-ATPase des Herz- und Skelettmuskels.
Arch.int.Pharmakodyn. 166, 342 - 349, (1967)
94. KINNE, R. und KINNE-SAFFRAN, E.: Isolierung und enzymatische Charakterisierung einer Bürstensaumfraktion der Rattenniere.
Pflügers Arch. 308, 1 - 15, (1969)
95. LUTZ, F., and FRIMMER, M.: A new method for the isolation of plasma membranes from pig liver.
Hoppe-Seylers Z.f.Physiol.Chem. 351, 1429 - 1434, (1970)
96. DRANSFELD, H. und GREEF, K.: Der Einfluß des Prednisolon auf die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -stimulierte Membran-ATPase des Meerschweinchenherzens.
Arch.Pharmak.exp.Path. 249, 425, (1964)
97. HEGNER, D.: Kationenabhängige Membran-ATPasen in lysosomalen Granula aus polymorphkernigen Rinderleukozyten.
Arch.Pharmak.exp.Path. 263, 408 - 416, (1969)
98. JØRGENSEN, P.L., SKOU, J.C., and SOLOMONSEN, L.D.: Purification and characterization of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$.
Biochim.Biophys.Acta 233, 381 - 394, (1971)

99. DIAMOND, J.M., and D.TORMEY, MC, J.: Role of long extracellular channels in fluid transport across epithelia.
Nature 210, 817 - 820, (1966)
100. CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y., WARNER, H.: Microdetermination of phosphorus.
Anal.Chem. 28, 756, (1956)

Herrn Priv. Doz. Dr. D. Hegner danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen bei der Planung und Auswertung der Versuche.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. M. Frimmer für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, sowie Herrn Dr. B. Schnorr für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Lebenslauf

Am 21. Juli 1944 bin ich, Bernd Tellhelm, in Arnstadt in Thüringen geboren als Sohn des Landwirtes Hans Joachim Tellhelm und seiner Ehefrau Elise, geborenen Beythan.

Am 1. März 1963 erhielt ich das Reifezeugnis des Aufbaugymnasiums in Friedberg/Hessen.

Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Wintersemester 1963/64. Nachdem ich im Oktober 1965 die Tierärztliche Vorprüfung bestanden hatte, erhielt ich im Februar 1969 die Approbation als Tierarzt.

Seit Oktober 1969 bin ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Veterinärmedizinischen Fakultät, Gießen, mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32, Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449